



ANDREIA FILIPA ESPANHOL SILVA

Licenciada em Biologia Humana

MÉTODO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE UMA MONOCAMADA DE QUERATINÓCITOS COM BASE EM SISTEMAS EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS

MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR E BIOMEDICINA

Universidade NOVA de Lisboa
novembro, 2024

MÉTODO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE UMA MONOCAMADA DE QUERATINÓCITOS COM BASE EM SISTEMAS EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS

ANDREIA FILIPA ESPANHOL SILVA

Licenciada em Biologia Humana

Orientador: Ana Rita Cruz Duarte
Professora Associada com Agregação, Universidade
NOVA de Lisboa

Coorientadores: Ana Rita Xavier de Jesus Gameiro
Doutora, Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Margarida Casal Ribeiro Castro Caldas Braga
Professora Auxiliar, Universidade NOVA de Lisboa

Arguente: Maria Filomena Andrade de Freitas
Professora Auxiliar, Universidade NOVA de Lisboa

Vogal: Ana Rita Cruz Duarte
Professora Associada com Agregação, Universidade
NOVA de Lisboa

MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR E BIOMEDICINA

Universidade NOVA de Lisboa
novembro, 2024

MÉTODO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE UMA MONOCAMADA DE QUERATINÓCITOS COM BASE EM SISTEMAS EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS

Copyright © Andreia Filipa Espanhol Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que fizeram parte deste percurso, que estiveram presentes de alguma forma, que me ajudaram e apoiaram, quero expressar a minha gratidão.

Gostaria de começar por agradecer às minhas orientadoras, a Prof. Ana Rita Duarte e a Dr. Ana Rita Gameiro pela oportunidade que me deram de desenvolver este trabalho que tanto me ensinou e desafiou, ajudando-me sempre com paciência, disponibilidade e apoio.

Quero agradecer a todos os membros do grupo DES.solve que me ajudaram de uma forma ou de outra. Aos membros do 5º piso um especial agradecimento por me terem acolhido, ajudado sempre que precisei e acompanhado nesta caminhada. Aos meus colegas de mestrado que iniciaram comigo esta aventura. À Carolina e ao Diogo pela entreajuda, apoio, conselhos, conversas e risos, o meu obrigada por terem sido excelentes companheiros nesta jornada.

Os meus sinceros agradecimentos aos meus amigos, às minhas amigas do eterno grupo do serrado, que foram apoio, força e coragem nos momentos difíceis. Foram uma peça muito importante neste percurso, pois sempre que duvidei estavam lá para me contrariar e ajudar a seguir em frente.

À minha família, que foram a base que eu precisei. Obrigada pela força e coragem que sempre me deram, mesmo não compreendendo ao certo o que estava a fazer.

Aos meus pais por terem acreditado e investido em mim, e aos meus avós, também, por me terem ajudado a alcançar mais este patamar na minha vida.

À minha mãe, que sem ela isto não tinha sido possível. Nunca duvidou e fez-me sempre acreditar que era capaz. Para ti não há palavras que descrevam o quanto te estou agradecida. Foste o meu pilar e a pessoa que mais viveu e sentiu comigo tudo o que esta caminhada teve de bom e menos bom. Obrigada por todas as palavras, por toda a coragem e força, pelo amor e carinho e, pelo colo quando precisei.

À minha avó, a minha segunda mãe, que me ajudou sempre em tudo, que me deu força mesmo quando não sabia como e que viveu comigo este caminho.

Ao Gonçalo que foi uma das peças fundamentais nesta caminhada por toda a compreensão, paciência, ajuda, apoio, conforto, colo e presença na minha vida.

Por fim, gostaria de agradecer o financiamento deste trabalho pela European Union's Horizon 2020 -European Research Council (ERC) - CryoDESERC-2022-POC2 101101088 e pelo Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) que é financiado por fundos nacionais da FCT/MCTES (LA/P/0008/2020, UIDP/50006/2020 e UIDB/50006/2020).

*“Coragem é só outro nome para o medo.
A emoção que enfrentamos é a mesma, o que muda é o que fazemos com ela”
(Autor desconhecido)*

RESUMO

O principal objetivo deste projeto foi explorar o potencial dos Sistemas Eutéticos Profundos Naturais (NADES) como agentes crioprotetores (CPAs) alternativos na criopreservação de estruturas celulares complexas, como o tecido cutâneo. Este estudo baseia-se em resultados prévios que demonstraram a eficácia dos NADES na criopreservação de células em suspensão, e visa testar a sua aplicação na criopreservação de monocamadas de queratinócitos humanos (células HaCaT). Para isso, foram otimizados protocolos de formação de monocamadas celulares e avaliada a capacidade protetora de diferentes sistemas durante o congelamento e descongelamento, comparando-os com o dimetilsulfóxido (DMSO), o CPA padrão, conhecido pela sua eficácia, mas cuja toxicidade é um fator limitante.

As soluções crioprotetoras à base de NADES foram caracterizadas por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e microscopia ótica com luz polarizada (POM). Em termos de citotoxicidade, as soluções não se mostraram tóxicas durante o período de congelamento/descongelamento. Foram realizados diversos ensaios de criopreservação das monocamadas celulares em placas de cultura para avaliar a capacidade protetora das soluções com os NADES.

Os resultados indicaram que, embora os NADES apresentem propriedades promissoras como CPAs, ainda enfrentam desafios significativos na preservação de monocamadas celulares, principalmente devido à formação de cristais durante o protocolo de congelamento, observados por POM, e à pouca eficácia do protocolo de descongelamento utilizado, relacionada com os tempos prolongados de descongelamento. A análise térmica demonstrou que os NADES influenciam as propriedades térmicas do meio de cultura, reduzindo as temperaturas de fusão (T_m) e de cristalização (T_c). Contudo, em todos os ensaios de criopreservação da monocamada, a viabilidade celular permaneceu baixa (entre 20% e 30%), mesmo com diversas otimizações feitas ao protocolo.

Resumindo, os resultados mostraram que, apesar do potencial dos NADES como CPAs, são necessárias mais otimizações neste protocolo de criopreservação para superar desafios como a formação de cristais de gelo e os tempos prolongados de descongelamento, que levam a fenômenos, como a recristalização e consequentemente a dano celular. No entanto, este trabalho contribui como ponto de partida para futuras inovações na criopreservação bem-sucedida de tecidos, em particular do tecido cutâneo, altamente procurado na medicina regenerativa.

Palavras-chave: Criopreservação, tecido cutâneo, agentes crioprotetores, NADES, DMSO

ABSTRACT

The main objective of this project was to explore the potential of Natural Deep Eutectic Systems (NADES) as alternative cryoprotectant agents (CPAs) in the cryopreservation of complex cellular structures, such as skin tissue. This study is based on previous results demonstrating the efficacy of NADES in the cryopreservation of cells in suspension and aimed to test their application in the cryopreservation of human keratinocyte monolayers (HaCaT cells). To this end, protocols for establishing cell monolayers were optimized. The protective capacity of different systems during freezing and thawing was evaluated, comparing them with dimethyl sulfoxide (DMSO), the standard CPA, which is known for its efficacy but whose toxicity is a limiting factor.

The NADES-based cryoprotectant solutions were characterized by differential scanning calorimetry (DSC) and polarized light microscopy (POM). In terms of cytotoxicity, the solutions were not toxic during the freeze-thaw period. Several cryopreservation assays were carried out on the cell monolayers in culture plates to assess the protective capacity of the solutions containing the NADES.

The results indicated that, although NADES showed promising properties as CPAs, they still face significant challenges in preserving cell monolayers. This occurs mainly due to crystal formation during the freezing protocol, observed in the POM analyses, and the poor effectiveness of the thawing protocol used, related to prolonged thawing times. Thermal analysis showed that NADES influence the thermal properties of the culture medium, reducing the melting (T_m) and crystallization (T_c) temperatures. However, in all the monolayer cryopreservation assays, the cell viability remained low (between 20% and 30%), even after different optimization steps made to the protocol.

In summary, the results showed that, despite the potential of NADES as CPAs, further optimization is needed in the cryopreservation protocol designed in this project, to overcome the challenges such as the formation of ice crystals and prolonged thawing times which leads to recrystallization and consequently cell damage. Nevertheless, this work contributed as a starting point for future innovations in tissue cryopreservation, particularly skin tissue, which is a key area of interest within regenerative medicine.

Keywords: Cryopreservation, skin tissue, cryoprotective agents, NADES, DMSO

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
ÍNDICE DE CONTEÚDOS.....	XV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XXI
LISTA DE ABREVIATURAS	XXIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MEDICINA REGENERATIVA	1
1.1.1. <i>Regeneração do tecido cutâneo</i>	1
1.2. CRIOPRESERVAÇÃO.....	3
1.2.1. <i>Congelamento lento</i>	5
1.2.2. <i>Vitrificação</i>	5
1.2.3. <i>Agentes crioprotetores</i>	7
1.2.3.1. Dimetilsulfóxido (DMSO).....	9
1.2.3.2. Glicerol	10
1.2.3.3. Trealose	11
1.3. QUÍMICA VERDE E SISTEMAS EUTÉTICOS PROFUNDOS	12
1.3.1. <i>Sistemas Eutéticos Profundos (DES)</i>	12
1.3.2. <i>Sistemas Eutéticos Profundos Naturais (NADES)</i>	14
1.3.2.1. NADES como CPA alternativo	15
2. OBJETIVO	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. PREPARAÇÃO DOS NADES.....	21
3.2. DSC.....	21
3.3. CULTURA E SUBCULTURA CELULAR.....	22
3.4. DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS	23
3.5. OTIMIZAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR EM PLACAS DE 6 POÇOS.....	23
3.6. AVALIAÇÃO DOS TEMPOS DE DESCONGELAMENTO	25

3.7.	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS NADES.....	25
3.7.1.	Ensaio MTS	26
3.8.	CRIOPRESERVAÇÃO DE MONOCAMADAS CELULARES	27
3.8.1.	<i>Congelamento de monocamadas celulares em placas</i>	27
3.8.1.1.	Ensaio alamarBlue™	28
3.8.2.	<i>Descongelamento de monocamadas celulares em placas</i>	28
3.9.	POM	29
3.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1.	CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DE MISTURAS DMEM/NADES	31
4.2.	OTIMIZAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR EM PLACAS DE 6 POÇOS.....	34
4.3.	AVALIAÇÃO DO TEMPO DE DESCONGELAMENTO.....	36
4.4.	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS NADES.....	38
4.5.	CRIOPRESERVAÇÃO DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HACAT UTILIZANDO OS NADES COMO CPAs	41
4.6.	ANÁLISE DAS SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS POR POM	52
5.	CONCLUSÕES	55
6.	PRESPECTIVAS FUTURAS	57
	BIBLIOGRAFIA.....	59
A.	INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR.....	67
A.1.	ANÁLISE POR DSC	67
A.2.	CRIOPRESERVAÇÃO A -20 °C EM PLACAS DE 6 POÇOS.....	70
A.3.	CRIOPRESERVAÇÃO A -80 °C EM PLACAS DE 6 POÇOS.....	72
A.4.	CRIOPRESERVAÇÃO A -80 °C EM PLACAS DE 24 POÇOS.....	75
A.5.	ANÁLISE POR POM.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. ANATOMIA DA PELE (CRIADO COM BIORENDER.COM).....	2
FIGURA 1.2. IMPORTÂNCIA DO USO DE UM AGENTE CRIOPROTETOR (CPA) DURANTE O PROCESSO DE CONGELAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS [19].	4
FIGURA 1.3. DIAGRAMA DE FASES TEÓRICO PARA UM SISTEMA EUTÉTICO PROFUNDO BINÁRIO [70].	13
FIGURA 3.1. CÉLULAS HACAT EM CULTURA.	22
FIGURA 3.2. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA CÂMARA DE NEUBAUER UTILIZADO NA CONTAGEM CELULAR.	23
FIGURA 3.3. REAÇÃO QUÍMICA DO ENSAIO MTS EM CÉLULAS VIÁVEIS. CRIADO COM BIORENDER.	26
FIGURA 3.4. REAÇÃO QUÍMICA DO ENSAIO ALAMARBLUE™ EM CÉLULAS VIÁVEIS. CRIADO COM BIORENDER.	28
FIGURA 4.1. TERMOGRAMA DA SOLUÇÃO DE 10% (v/v) DE DMSO COM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO (DMEM + 10% FBS). EXEMPLO REPRESENTATIVO DO PERFIL TERMOGRÁFICO OBTIDO PARA TODAS AS SOLUÇÕES ANALISADAS.....	33
FIGURA 4.2. OTIMIZAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DE CÉLULAS HACAT PARA OBTENÇÃO DE UMA MONOCAMADA CONFLUENTE EM PLACAS DE 6 POÇOS. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± DESVIO PADRÃO, COM PELO MENOS 3 REPLICADOS. AS DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS FORAM DETERMINADAS PELO TESTE DE COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS TUKEY'S. NESTA ANÁLISE, NÃO FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ($P < 0,05$) ENTRE OS GRUPOS, QUE FORAM REPRESENTADAS COMO NS.....	35
FIGURA 4.3. FOTOGRAFIAS DE UMA MONOCAMADA DE CÉLULAS HACAT CONFLUENTE EM PLACAS DE 96 POÇOS (A) E EM PLACAS DE 6 POÇOS (B), OBTIDAS COM O MICROSCÓPIO INVERTIDO AXIO VERT A1 (ZEISS), COM ESCALA DE 100 μ m. AS CÉLULAS FORAM CULTIVADAS EM MEIO DMEM SUPLEMENTADO COM 10% DE FBS E INCUBADAS A 37 °C COM 5% DE CO ₂ . A CONFLUÊNCIA TOTAL FOI ATINGIDA APÓS 72 HORAS DE CULTIVO.	35
FIGURA 4.4. VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS HACAT APÓS 5 E 10 MINUTOS DE INCUBAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DMSO E DO NADES TRE:GLI. O CONTROLO É COMPOSTO APENAS POR CÉLULAS HACAT CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=3). AS DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS FORAM DETERMINADAS PELO TESTE DE COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS TWO-	

WAY ANOVA. NESTA ANÁLISE NÃO FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ($P < 0,05$) NOS DIFERENTES GRUPOS QUANDO COMPARADOS COM O CONTROLO, REPRESENTADAS POR NS.	39
FIGURA 4.5. VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS HaCAT APÓS 5, 10 E 15 MINUTOS DE INCUBAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS NADES GLI:GLU E BET:GLI:SAC:H ₂ O. O CONTROLO É COMPOSTO APENAS POR CÉLULAS HaCAT CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO (N=3). AS DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS FORAM DETERMINADAS PELO TESTE DE COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS TWO-WAY ANOVA. NESTA ANÁLISE NÃO FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ($P < 0,05$) ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS, REPRESENTADAS POR NS.	40
FIGURA 4.6. FOTOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HaCAT CONFLUENTE EM PLACAS DE 96 POÇOS ANTES DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DMSO E DOS NADES EM ESTUDO (A) E APÓS ESSA EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL DEFINIDO (B), OBTIDAS COM O MICROSCÓPIO INVERTIDO AXIO VERT A1 (ZEISS), COM ESCALA DE 100 μ M.	40
FIGURA 4.7. QUANTIDADE DE RESAZURINA REDUZIDA (%), OBTIDA ATRAVÉS DO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR ALAMARBLUE™ EM PLACAS DE 6 POÇOS, ANTES DO CONGELAMENTO DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HaCAT; E APÓS UMA SEMANA, NO DIA EM QUE FOI DESCONGELADA (T0) E NOS 2 DIAS SEGUINTE (T1 E T2). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO (N=3). AS DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS FORAM DETERMINADAS PELO TESTE DUNNETT 'S PARA COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS ENTRE O MOMENTO ANTES DO CONGELAMENTO E APÓS O DESCONGELAMENTO (T0, T1 E T2), PARA CADA CPA EM ANÁLISE (10% DMSO, 10% TRE:GLI, 10% GLI:GLU E 10% BET:GLI:SAC:H ₂ O), E ESTÃO REPRESENTADAS EM ASTERISCOS: **** $P < 0,0001$, TWO-WAY ANOVA.	43
FIGURA 4.8. FOTOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DAS DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO A -20 °C DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HaCAT EM PLACAS DE 6 POÇOS. AS IMAGENS OBTIDAS COM O MICROSCÓPIO INVERTIDO AXIO VERT A1 (ZEISS), COM ESCALA DE 100 μ M, ILUSTRAM A EVOLUÇÃO DA MONOCAMADA AO LONGO DO TEMPO: A) ANTES DO CONGELAMENTO, B) IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO (T0), C) 1 DIA APÓS O DESCONGELAMENTO (T1), E D) 2 DIAS APÓS O DESCONGELAMENTO (T2). ESTA FIGURA REFERE-SE AO CONGELAMENTO UTILIZANDO A SOLUÇÃO CRIOPROTETORA COM 10% DE TRE:GLI.	44
FIGURA 4.9. QUANTIDADE DE RESAZURINA REDUZIDA (%), OBTIDA ATRAVÉS DO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR ALAMARBLUE™ EM PLACAS DE 6 POÇOS, ANTES DO CONGELAMENTO DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HaCAT; E APÓS UMA SEMANA, NO DIA EM QUE FOI DESCONGELADA (T0) E 2 DIAS APÓS O DESCONGELAMENTO (T2). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO (N=3). AS DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS FORAM DETERMINADAS PELO TESTE TUKEY 'S PARA COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS ENTRE O MOMENTO ANTES DO CONGELAMENTO E APÓS O DESCONGELAMENTO (T0 E T2), PARA CADA CPA EM ANÁLISE (DMSO A 10% E TRE:GLI A 10%,15% E 20%), E ESTÃO REPRESENTADAS EM ASTERISCOS: **** $P < 0,0001$, TWO-WAY ANOVA.....	46

- FIGURA 4.10.** FOTOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DAS DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO A -80°C DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HaCAT EM PLACAS DE 6 POÇOS. AS IMAGENS OBTIDAS COM O MICROSCÓPIO INVERTIDO AXIO VERT A1 (ZEISS), COM ESCALA DE $100\ \mu\text{M}$, ILUSTRAM A EVOLUÇÃO DA MONOCAMADA AO LONGO DO TEMPO: A) ANTES DO CONGELAMENTO, B) IMEDIATAMENTE DEPOIS DO DESCONGELAMENTO (T_0) E C) 2 DIAS APÓS O DESCONGELAMENTO (T_2). ESTA FIGURA REFERE-SE AO CONGELAMENTO UTILIZANDO A SOLUÇÃO CRIOPROTETORA COM 10% DE TRE:GLI.....47
- FIGURA 4.11.** QUANTIDADE DE RESAZURINA REDUZIDA (%), OBTIDA ATRAVÉS DO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR ALAMARBLUE[™] EM PLACAS DE 24 POÇOS, ANTES DO CONGELAMENTO DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HaCAT E APÓS UMA SEMANA, NO DIA EM QUE FOI DESCONGELADA (T_0). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO ($N=3$). AS DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS FORAM DETERMINADAS PELO TESTE BONFERRONI 'S PARA COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS ENTRE O MOMENTO ANTES DO CONGELAMENTO E APÓS O DESCONGELAMENTO, PARA CADA CPA EM ANÁLISE (DMSO A 10% E TRE:GLI A 10%,15% E 20%), E ESTÃO REPRESENTADAS EM ASTERISCOS: **** $p<0,0001$, TWO-WAY ANOVA.....49
- FIGURA 4.12.** FOTOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DAS DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO A -80°C DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HaCAT EM PLACAS DE 24 POÇOS. AS IMAGENS OBTIDAS COM O MICROSCÓPIO INVERTIDO AXIO VERT A1 (ZEISS), COM ESCALA DE $100\ \mu\text{M}$, ILUSTRAM A EVOLUÇÃO DA MONOCAMADA AO LONGO DO TEMPO: A) ANTES DO CONGELAMENTO, B) DEPOIS DO DESCONGELAMENTO (T_0). ESTA FIGURA REFERE-SE AO CONGELAMENTO UTILIZANDO A SOLUÇÃO CRIOPROTETORA COM 10% DE TRE:GLI. 49
- FIGURA 4.13.** IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓTICA COM LUZ POLARIZADA (POM) DA SOLUÇÃO CRIOPROTETORA SEM CPA (DMEM + 10% FBS), DA SOLUÇÃO CRIOPROTETORA COM 10% (v/v) DE DMSO E UMA IMAGEM REPRESENTATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AS SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS CONTENDO OS NADES, ESPECIFICAMENTE DA SOLUÇÃO COM 10% DO SISTEMA TRE:GLI. AS IMAGENS FORAM OBTIDAS ATRAVÉS DE DUAS CONDIÇÕES DIFERENTES: A) AMOSTRAS CONGELADAS FORA DE UMA CAIXA DE ESFEROVITE, E B) AMOSTRAS CONGELADAS NO INTERIOR DE UMA CAIXA DE ESFEROVITE. A ESCALA DAS IMAGENS FOI DE $500\ \mu\text{M}$ 52
- FIGURA A.1.** TERMOGRAMAS DAS SOLUÇÕES DE DMEM SUPLEMENTADO COM 10% DE SORO FETAL BOVINO, NAS SEGUINTE CONDIÇÕES: A) COM 10% DE GLI:GLU; B) COM 10% DE BET:GLI:SAC:H₂O; C) COM 10% DE TRE:GLI; D) COM 15% DE TRE:GLI; E) COM 20% DE TRE:GLI; E F) APENAS DMEM + 10% FBS.....70
- FIGURA A.2.** FOTOGRAFIAS DAS DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO A -20°C DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HaCAT EM PLACAS DE 6 POÇOS, UTILIZANDO AS SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS COM OS CPAS EM ANÁLISE: A) 10% DMSO, B) 10% GLI:GLU E C) 10% BET:GLI:SAC:H₂O. AS IMAGENS OBTIDAS COM O MICROSCÓPIO INVERTIDO AXIO VERT A1 (ZEISS), COM ESCALA DE $100\ \mu\text{M}$, ILUSTRAM A EVOLUÇÃO DA MONOCAMADA AO LONGO DO TEMPO: A) ANTES DO CONGELAMENTO, B) IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO (T_0), C) 1 DIA APÓS O DESCONGELAMENTO (T_1) E, D) 2 DIAS APÓS O DESCONGELAMENTO (T_2). 71

FIGURA A.3. FOTOGRAFIAS DAS DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO A -80 °C DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HACAT EM PLACAS DE 6 POÇOS, UTILIZANDO AS SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS COM OS CPAS EM ANÁLISE: A) 10% DMSO, B) 15% TRE:GLI E, C) 20% TRE:GLI. AS IMAGENS OBTIDAS COM O MICROSCÓPIO INVERTIDO AXIO VERT A1 (ZEISS), COM ESCALA DE 100 µM, ILUSTRAM A EVOLUÇÃO DA MONOCAMADA AO LONGO DO TEMPO: A) ANTES DO CONGELAMENTO, B) IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO (T0) E, C) 2 DIAS APÓS O DESCONGELAMENTO (T2).	74
FIGURA A.4. FOTOGRAFIAS DAS DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO A -80 °C DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HACAT EM PLACAS DE 24 POÇOS, UTILIZANDO AS SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS COM OS CPAS EM ANÁLISE: A) 10% DMSO, B) 15% TRE:GLI E, C) 20% TRE:GLI. AS IMAGENS OBTIDAS COM O MICROSCÓPIO INVERTIDO AXIO VERT A1 (ZEISS), COM ESCALA DE 100 µM, ILUSTRAM A EVOLUÇÃO DA MONOCAMADA AO LONGO DO TEMPO: A) ANTES DO CONGELAMENTO E, B) IMEDIATAMENTE APÓS O DESCONGELAMENTO (T0).....	75
FIGURA A.5. IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓTICA COM LUZ POLARIZADA (POM) DAS SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS DE DMEM SUPLEMENTADO COM 10% DE FBS COM: A) 15% TRE:GLI, B) 20% TRE:GLI, C) 10% GLI:GLU E, D) 10% BET:GLI:SAC:H ₂ O. AS IMAGENS FORAM OBTIDAS ATRAVÉS DE DUAS CONDIÇÕES DIFERENTES: 1) AMOSTRAS CONGELADAS FORA DE UMA CAIXA DE ESFEROVITE, E 2) AMOSTRAS CONGELADAS NO INTERIOR DE UMA CAIXA DE ESFEROVITE. A ESCALA DAS IMAGENS FOI DE 500 µM.....	76

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.1 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DO CONGELAMENTO LENTO E DA VITRIFICAÇÃO, OS DOIS MÉTODOS USADOS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS.	7
TABELA 1.2 - PRINCIPAIS AGENTES CRIOPROTETORES (CPAs) PENETRANTES E NÃO PENETRANTES UTILIZADOS NA CRIOPRESERVAÇÃO.	9
TABELA 3.1 - PREPARAÇÃO DOS NADES.	21
TABELA 3.2 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS/POÇO OBTIDOS PARA A OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS NAS DIFERENTES PLACAS (24, 12 E 6 POÇOS), TENDO EM CONTA A ÁREA DE CRESCIMENTO (POÇO) CORRESPONDE E AS CARACTERÍSTICAS CORRESPONDENTES EM PLACAS DE 96 POÇOS, COMO REFERÊNCIA. OS VALORES DAS ÁREAS DE CRESCIMENTO (POÇO) UTILIZADOS TIVERAM POR BASE AS ESPECIFICAÇÕES DESCRITAS NAS CARACTERÍSTICAS DAS PLACAS FORNECIDAS PELA MARCA.	24
TABELA 4.1 - VALORES DAS TEMPERATURAS DE CRISTALIZAÇÃO (T_c – OBTIDO NO VALOR MÁXIMO DO PICO) E DE FUSÃO (T_m – OBTIDO NO VALOR MÁXIMO DO PICO) DAS MISTURAS DE 10%, 15% E 20% (M/V) DO NADES TRE:GLI, DE 10% (M/V) DOS NADES GLI:GLU E BET:GLI:SAC:H ₂ O, E DE 10% (V/V) DE DMSO COM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO (DMEM + 10% FBS). OS VALORES PARA O MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO TAMBÉM ESTÃO INDICADOS.....	32
TABELA 4.2 - TEMPOS DE DESCONGELAMENTO DAS DIFERENTES SOLUÇÕES UTILIZADAS NO CONGELAMENTO (DMEM + 10% FBS), CONTENDO AS VÁRIAS PERCENTAGENS SELECIONADAS DOS NADES E 10% DE DMSO. OS TEMPOS FORAM REGISTRADOS DESDE A COLOCAÇÃO DE UMA PLACA DE 6 POÇOS COM AS SOLUÇÕES CONGELADAS NUMA INCUBADORA A 37 °C ATÉ AO SEU COMPLETO DESCONGELAMENTO.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

Bet	Betaína
CPA(s)	Agente(s) crioprotetor(es)
Da	Dalton
DES	Sistemas Eutéticos Profundos
DMEM	Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DSC	Calorimetria Diferencial de Varrimento
EG	Etilenoglicol
ESCs	Células estaminais embrionárias
FBS	Soro fetal bovino
FD	Fator de diluição
Gli	Glicerol
Glu	Glucose
HBA	Aceitador de ligações de hidrogénio
HBD	Dador de ligações de hidrogénio
ILs	Líquidos iónicos
iPSCs	Células estaminais pluripotentes induzidas

MSCs	Células estaminais mesenquimais
NADES	Sistemas Eutéticos Profundos Naturais
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PG	Propilenoglicol
POM	Microscopia ótica com luz polarizada
PS	Penicilina-estreptomicina
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
Sac	Sacarose
T0	Dia do descongelamento
T1	Um dia após o descongelamento
T2	Dois dias após o descongelamento
T_c	Temperatura de cristalização
T_g	Temperatura de transição vítrea
T_m	Temperatura de fusão
Tre	Trealose

INTRODUÇÃO

1.1. Medicina Regenerativa

A maioria das doenças humanas, sejam lesões, infecções, doenças crônicas ou doenças degenerativas, danificam os tecidos. Além disso, 45% de todas as mortes podem ser associadas a falhas regenerativas relacionadas com processos inflamatórios e fibrose. Assim, a restauração dos tecidos e órgãos após danos causados é fundamental [1], [2].

Neste contexto, a medicina regenerativa surge como uma área emergente que visa substituir, reparar ou regenerar células, tecidos e órgãos, que se tornaram inviáveis ou que foram comprometidos por doenças ou outros fatores. Embora, o seu conceito seja amplo, este abrange diversas abordagens e tecnologias terapêuticas, como a aplicação de medicamentos compostos por pequenas moléculas, terapias biológicas, engenharia de tecidos, entre outros. O objetivo final é a restauração da função normal de tecidos ou órgãos afetados [1], [3], [4].

Os principais desafios prendem-se em garantir a segurança e eficácia das terapias (celulares, genéticas, entre outras), ultrapassando a barreira da rejeição imunológica inerente a muitos destes procedimentos [1]. Adicionalmente, existem diversos problemas éticos que variam conforme a área da medicina regenerativa e o avanço científico, muitas vezes agravados pelas incertezas e lacunas no conhecimento desta área da ciência [3].

1.1.1. Regeneração do tecido cutâneo

A pele, o maior órgão do corpo humano, está continuamente exposta a uma variedade de lesões, desde feridas, queimaduras a doenças autoimunes. Neste contexto, a reparação de feridas na pele tem vindo a ser um desafio ao longo dos tempos, em particular de lesões cutâneas densas que envolvem a espessura total, como por exemplo, queimaduras graves [5], [6].

A solução ideal para a reparação causada por perda do tecido cutâneo deveria incluir todas as camadas da pele, bem como os apêndices cutâneos, tais como as glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e nervos (sensibilidade) e, adicionalmente a pigmentação (figura 1.1) [6].

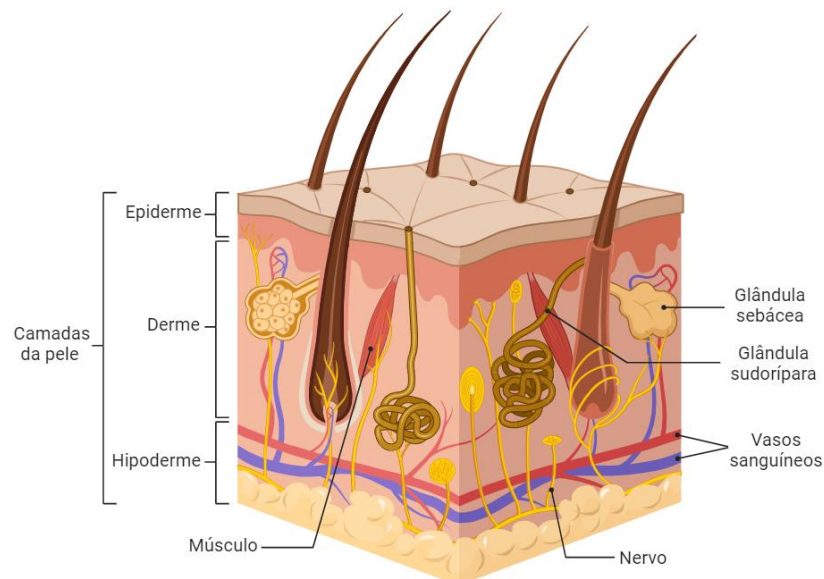


Figura 1.1. Anatomia da pele (Criado com BioRender.com).

O tratamento clássico para o tratamento de perdas extensas de tecido cutâneo, devido a trauma ou queimaduras, tem sido o enxerto de pele de espessura parcial. Porém, este tipo de enxerto apresenta várias complicações e limitações: falta de inclusão dos apêndices cutâneos, o que induz incapacidade da área enxertada transpirar; privação de sebo naquela zona contribuindo para uma secura da pele, e adicionalmente, diminuição da sensibilidade na área enxertada pela falta dos nervos associados, o que pode ser incapacitante para o paciente; a existência de cicatrizes hipertróficas, prurido e dor associados à zona do enxerto, revelando-se fatores debilitantes; e por fim o facto de serem predominantemente epidérmicos e interligados, de modo a permitirem uma cobertura mais ampla da lesão, o que resulta numa aparência visualmente desagradável e desadequada, designada por “pele de peixe”. A pigmentação do enxerto ser normalmente mais clara ou mais escura do que a zona circundante geralmente resulta em problemas de imagem corporal para os pacientes [6], [7].

Neste sentido, foram desenvolvidas estratégias adicionais para ultrapassar as desvantagens associadas aos enxertos de pele de espessura parcial. Os substitutos dérmicos acelulares, isto é biomateriais desprovidos de células que foram projetados para atuar como uma barreira de proteção contra a perda de líquidos e infecção subsequente da ferida. Contudo apresentam ainda algumas limitações, tais como, não incluírem os apêndices celulares, existência de risco de transmissão de doenças associado, serem pouco eficazes na sua função, possuírem um curto prazo de validade, não eliminarem os problemas associados à existência de cicatrizes e pigmentação inadequada, e além disso, pelo facto de não serem soluções biológicas, tem associados riscos de infecção consequente e rejeição por parte do paciente. Com o objetivo de mitigar estas limitações, foram desenvolvidos substitutos dérmicos celulares, nos quais são incluídos diferentes tipos de células que vão promover a regeneração da pele devido à secreção de fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular [6], [7].

Adicionalmente, várias estratégias de terapia celular, uma abordagem da medicina regenerativa, têm vindo a ser desenvolvidas. As células estaminais mesenquimais (MSCs) foram

pela primeira vez observadas na medula óssea em 1867 por Cohnheim, ao descobrir que essas células poderiam estar envolvidas na reparação de feridas como fonte de fibroblastos. Os fibroblastos são células mesenquimais do tecido conjuntivo, responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular, que desempenham um papel fundamental na cicatrização de feridas e na resposta inflamatória [8]. Subsequentemente, devido ao seu fácil isolamento, expansão e multipotencialidade, as MSCs tornaram-se um elemento terapêutico bastante promissor na medicina regenerativa [5], [9]. Neste contexto, as MSCs são apropriadas por várias razões, tais como, a sua capacidade de se diferenciarem em diversos tipos celulares; facilidade de isolamento dos tecidos provenientes, o que simplifica o uso em laboratório e aplicações clínicas; existem menos implicações éticas associadas, comparativamente às células estaminais embrionárias (ESCs), uma vez que a sua obtenção não envolve o uso de embriões; apresentam um menor risco de formação de teratomas, tumores potencialmente perigosos devido à sua composição, contrariamente às células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs); por último, são úteis numa vasta gama de aplicações, por possuírem a capacidade de migrar para tecidos danificados em resposta a sinais químicos. Esta última característica permite a sua aplicação direcionada para o tratamento de tecidos lesionados de diferentes origens, tornando-as em conjunto com todas as suas propriedades, uma ferramenta promissora para tratamentos inovadores, como a regeneração da pele, tendo em conta a existência de casos relatados que demonstraram o seu sucesso neste campo [5], [10], [11], [12], [13].

Apesar destas últimas abordagens terem demonstrado resultados promissores e um grande avanço na medicina regenerativa, especialmente pelo facto de terem melhorado a qualidade da cicatrização das feridas, existem ainda algumas limitações associadas à utilização de MSCs [6], [12]. Limitações relacionadas com a reduzida viabilidade celular no local lesionado após a sua aplicação e, subsequentemente a sua segurança a longo prazo, bem como a determinação da origem ideal das MSCs e os seus métodos de processamento e administração ainda pouco definidos e desenvolvidos condicionam significativamente o potencial desta terapia celular [12], [14]. Adicionalmente, o armazenamento eficiente das células estaminais é essencial ao sucesso e à necessidade da sua aplicação. Neste sentido, garantir a sua criopreservação de forma eficaz é fundamental, pelo facto de permitir a sua preservação por longos períodos de tempo, permitindo a sua disponibilidade face à necessidade. Contudo, existem problemas inerentes a este armazenamento que ainda não foram ultrapassados, nomeadamente o facto de ainda não existirem métodos completamente eficazes de preservação destas células que conseguem evitar danos químicos e/ou físicos durante o processo de congelamento e/ou descongelamento e, assim garantir a sua total viabilidade após o armazenamento, constituindo um desafio à sua aplicação. Neste sentido, continuam a ser necessárias novas soluções, que aumentem a eficiência da criopreservação [15].

1.2. Criopreservação

A criopreservação é considerada como o método mais comumente usado para armazenar sistemas biológicos por longos períodos de tempo e, em seguida, recuperá-los sem comprometer o seu metabolismo e com poucos ou nenhuns danos na sua estrutura biológica. De

forma geral, este método utiliza uma gama de temperaturas extremamente baixas que garantem meses e/ou anos de armazenamento [16].

A preservação de material biológico por períodos de tempo significativos requer a interrupção reversível das reações químicas existentes, pelo que o seu armazenamento é feito normalmente a temperaturas muito inferiores a 0 °C. Desta forma, existe inevitavelmente formação de gelo na amostra, inerente ao processo, que pode comprometer a viabilidade celular, caso haja formação de cristais de gelo pontiagudos. Assim, evitar a formação destes cristais, é fundamental para uma criopreservação bem-sucedida, sendo este um fator chave [17], [18]. Neste sentido, a prevenção da formação de cristais de gelo no meio intracelular e consequentemente, a manutenção da viabilidade celular, podem ser alcançadas quando solutos específicos, designados por agentes crioprotetores (CPAs) são adicionados às células, constituindo assim um elemento crucial ao processo (figura 1.2) [17], [18].

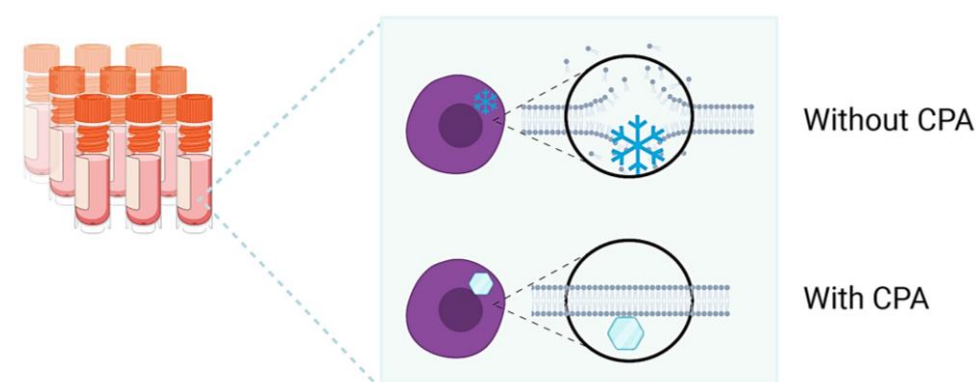


Figura 1.2. Importância do uso de um agente crioprotetor (CPA) durante o processo de congelamento de amostras biológicas [19].

Durante o século XX, registou-se um notável progresso no desenvolvimento da criopreservação, como método de preservação e armazenamento de sistemas biológicos, com grande impacto em diversos aspetos da sociedade [20], [21]. A generalização de estudos celulares *in vitro* foi possível através do desenvolvimento de métodos simples e robustos de criopreservação de células individuais, que contribuíram substancialmente para o avanço científico da biologia e medicina a nível mundial. Do ponto de vista comercial, este progresso permitiu o aparecimento de novas oportunidades de mercado relacionadas com o armazenamento e aplicação de diversas amostras biológicas, como por exemplo, óvulos, espermatozoides, embriões, células estaminais, entre outras. Este impacto refletiu-se no aumento crescente de clínicas de reprodução medicamente assistida e de bancos de células, ao longo das últimas décadas. No âmbito da saúde humana, o desenvolvimento deste método, tem sido um contributo bastante valioso no armazenamento de células estaminais para o tratamento de inúmeras doenças [21].

Todavia, as técnicas de criopreservação atuais ainda não são totalmente satisfatórias para tecidos e órgãos, que devido à sua complexidade acrescida pressupõem muitos mais problemas associados, tais como, o facto das técnicas atuais de criopreservação implicarem que o congelamento seja feito imediatamente após a adição do CPA, com tempos de incubação

curtos, pelo que não há tempo suficiente para que haja uma proteção total de todas as camadas celulares, deixando-as suscetíveis a danos durante o procedimento; a diversidade de tipos de células e densidades celulares, bem como as diferenças morfológicas entre as células que os constituem, afeta o comportamento térmico e osmótico dos tecidos e órgãos, o que influencia a sua resposta biológica face ao processo de congelamento e descongelamento, apesar de serem constituídos por células individuais passíveis de serem criopreservadas com sucesso; além disso, as interações célula-célula e célula-matriz existentes são comprometidas, o que resulta na baixa sobrevivência após o processo de congelamento [21], [22]. De um modo geral, a criopreservação de células isoladas em suspensão, apresenta significativamente melhores resultados, pelo facto de existirem recomendações específicas para cada tipo de célula e protocolos otimizados, que podem ser aplicados em cada caso, devido à complexidade mais reduzida [23], [24].

Podem ser usados dois métodos diferentes para criopreservar células: o congelamento lento e a vitrificação, que visam ultrapassar os danos causados pelos cristais de gelo e/ou pela presença de agentes crioprotetores em elevadas concentrações que causam toxicidade, prejudicando a viabilidade celular durante o congelamento e descongelamento [18], [25], [26]. A escolha do tipo de abordagem encontra-se diretamente relacionada com a natureza e complexidade da amostra biológica, bem como com a sua área de aplicação futura, como por exemplo, pesquisa científica ou aplicação clínica, entre outras [17], [23].

1.2.1. Congelamento lento

O primeiro método, o congelamento lento, utiliza agentes crioprotetores (CPAs), em baixa concentração (aproximadamente 1,5 M), e taxas de arrefecimento lentas que permitem a deslocação da água presente nas células para o meio de criopreservação, onde o gelo será formado maioritariamente, diminuindo assim a disponibilidade de água no meio intracelular. Todavia, existe formação de cristais de gelo associada a este método, o que é desvantajoso. A baixa concentração do CPA constitui uma vantagem devido ao menor potencial de risco químico para danos celulares [18], [25], [27].

As desvantagens associadas a este procedimento envolvem a necessidade de existir um controlo rigoroso e preciso do processo de congelamento, de modo a prevenir possíveis danos celulares causados pelas taxas de arrefecimento, o que pressupõe a exigência de equipamento especializado que permita esse controlo. Além disso, é um método moroso, que implica um elevado tempo de exposição devido às taxas de arrefecimento lentas, que geralmente destrói a matriz extracelular, tornando-o ineficaz para a preservação de tecidos e órgãos [25], [27].

1.2.2. Vitrificação

Na vitrificação, o segundo método de criopreservação, é adicionada uma elevada concentração de agentes crioprotetores (CPAs) às células (3-6 M), antes do congelamento. O objetivo é manter a solução que contém as células num estado não cristalino ou amorfo conhecido como estado vítreo, durante o processo de congelamento, de modo a evitar a cristalização da água [18], [28], [29].

Uma vez que a formação de cristais de gelo é evitada, este procedimento não requer um arrefecimento lento, pelo contrário, é realizado através de um arrefecimento rápido abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g), na qual ocorre a transição da amostra para o estado vítreo [28].

A vitrificação é, então, definida como uma alteração estrutural da amostra, ou seja, a solução que contém a amostra biológica solidifica sem que ocorra cristalização, devido ao aumento da concentração de soluto e/ou ao aumento da velocidade de arrefecimento, de modo que o aumento da viscosidade seja suficiente para inibir a nucleação do gelo e, assim, evitar a sua formação. À medida que a taxa de arrefecimento aumenta, ocorre um aumento contínuo da viscosidade da solução até um ponto suficientemente alto que permita ao sistema exibir propriedades de um sólido, mas manter a sua estrutura molecular de líquido [30], [31].

A eficácia deste processo de criopreservação foi validada em 1968, através da preservação da manutenção da atividade biológica e estabilidade molecular, em eritrócitos humanos, utilizando uma solução concentrada de glicerol [31], [32]. A criopreservação por vitrificação tem demonstrado um crescimento exponencial desde os primeiros anos da década de 80, e em 1985, foi pela primeira vez demonstrada a sua eficácia na preservação de embriões de rato [33].

Neste método de criopreservação, as lesões causadas pelo arrefecimento da amostra são evitadas devido ao comportamento térmico da amostra não apresentar passos de cristalização, pelo que, não requer um controlo da temperatura de arrefecimento tão rigoroso como o congelamento lento, não necessitando de equipamento especializado. Além disso, pressupõe um tempo de exposição da amostra curto, devido às rápidas taxas de arrefecimento, o que o torna num procedimento rápido [27], [29].

Os desafios associados ao processo de vitrificação centram-se principalmente no potencial efeito tóxico decorrente da elevada concentração de agentes crioprotetores, adicionados às células, e nos efeitos osmóticos resultantes da sua adição e remoção. Devido a estes fatores de risco, exige um conhecimento técnico e clínico mais especializado [27], [29]. Adicionalmente, o arrefecimento rápido e/ou o aquecimento rápido abaixo da temperatura de transição vítrea pode induzir a quebra do estado vítreo da amostra biológica, causando lesões celulares irreversíveis, bem como nucleação de gelo. Por vezes, o meio que envolve a amostra biológica não fica totalmente vitrificado o que pode prejudicar o sucesso do processo. Contudo, a maioria das células sobrevive à criopreservação, mesmo nessas circunstâncias [29].

Na comunidade científica, é maioritariamente aceite que a vitrificação apresenta um melhor desempenho em comparação com o congelamento lento, no entanto ambos os métodos apresentam desvantagens e, consequentemente, vantagens quando comparados (tabela 1.1) [26].

Tabela 1.1 - Vantagens e desvantagens do congelamento lento e da vitrificação, os dois métodos usados na criopreservação de células.

	Vantagens	Desvantagens
Congelamento lento	Baixa concentração de CPA	Formação de cristais de gelo
	Reduzido risco químico de danos celulares	Controlo rigoroso do processo de congelamento (equipamento especializado)
		Método moroso com elevado tempo de exposição da amostra
Vitrificação	Não há formação de cristais de gelo	Elevada concentração de CPA
	Não exige equipamento especializado	Elevado risco químico de danos celulares
	Método rápido com pouco tempo de exposição da amostra	Exige mais conhecimento clínico

1.2.3. Agentes crioprotetores

Os agentes crioprotetores (CPAs), elementos fundamentais ao sucesso da criopreservação de amostras biológicas, compreendem uma enorme variedade de moléculas, como por exemplo, açúcares, aminoácidos, polissacáridos, poliálcoois, amidas e alguns polímeros [16], [34]. Podem ser classificados como CPAs penetrantes os que apresentam geralmente baixo peso molecular, inferior a 100 Dalton (Da), e não penetrantes os que apresentam elevado peso molecular, o qual está compreendido entre 180-600 Da. Existem ainda, polímeros que possuem moléculas de alto peso molecular (superior a 1000 Da), designados também como CPAs não penetrantes [35], [36], [37].

Os CPAs penetrantes devem ser bastantes solúveis em água a temperaturas baixas, e capazes de interagir, estabilizar e penetrar as membranas celulares [28], [38]. Estes evitam o crescimento de gelo ao penetrarem a membrana celular, reduzindo a desidratação, e consequentemente a disponibilidade de moléculas de água [24], [37], [39]. Ou seja, à medida que a água congela, ocorre um consequente aumento da concentração de soluto letal no interior da célula. Os CPAs penetrantes ao interagirem fortemente com as moléculas de água por pontes de hidrogénio, reduzem o número de moléculas livres para interagirem entre si e, deste modo formarem locais de nucleação necessários à formação de cristais de gelo [24], [40]. O etilenoglicol (EG), o propilenoglicol (PG), o dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol, são alguns exemplos de agentes crioprotetores penetrantes [24], [37], [39].

Por outro lado, os CPAs não penetrantes, como o próprio nome indica, não atravessam a membrana celular, estabelecendo apenas interações com os grupos polares de biomoléculas nela presentes, estabilizando-as, e exercendo o seu efeito protetor no meio extracelular. Além disso, promovem a formação do estado vítreo pelo mesmo mecanismo que os CPAs penetrantes, mas extracelularmente, ou seja, aumentam a osmolaridade extracelular, causando desidratação celular, devido a existir uma menor quantidade de moléculas de água disponíveis no meio intracelular [23], [24], [38]. Açúcares, como a sacarose e a trealose, e polímeros de elevado peso molecular, como a polivinilpirrolidona (PVP), são alguns exemplos descritos de CPAs não penetrantes [29], [37], [41], [42].

Os agentes crioprotetores apresentam elevada viscosidade quando estão presentes em elevada concentração; conseguem interagir com as moléculas de água através de ligações pontes de hidrogénio; possuem uma elevada solubilidade e permeabilidade celular, no que diz respeito aos CPAs penetrantes [16], [18], [37]. Além destas características, alguns CPAs usados atualmente, como por exemplo o DMSO, possuem uma toxicidade inerente que compromete a sua utilização [18], [28], [43]. Apesar disso, quando são usados em elevadas concentrações, ambos os tipos de CPAs, podem ser tóxicos para as células, embora os não penetrantes apresentem um menor grau de toxicidade. A toxicidade apresentada pelos CPAs, é sem dúvida, uma característica prejudicial que deve ser tida em consideração, pelo facto de comprometer a viabilidade celular e consequentemente as taxas de sucesso do processo, e subsequente aplicação [24], [44].

No que diz respeito aos agentes crioprotetores, o principal fator limitante para a criopreservação bem-sucedida, é a necessidade contínua e predominante de dois agentes crioprotetores específicos, o DMSO e o glicerol, ambos considerados tóxicos, e que são necessários ao processo pela sua eficácia, apesar de existirem outros CPAs, pelo que estão sempre presentes quer sejam utilizados em separado ou em conjunto com outros. Portanto, as células precisam de ser congeladas imediatamente após a adição do(s) CPA(s), o que pressupõe tempos de incubação curtos, de modo a minimizar o máximo possível o tempo de exposição ao agente tóxico, limitando ainda mais a sua utilização aquando da criopreservação de tecidos e órgãos [21]. Neste sentido, surgiu a necessidade de encontrar soluções tão ou mais eficazes que ultrapassassem estas questões.

A combinação dos dois tipos de agentes crioprotetores permite diminuir a concentração de CPAs penetrantes, como o DMSO e o glicerol, diminuindo assim a toxicidade existente, o que se traduz num aumento da viabilidade celular e desempenho das funções celulares após o descongelamento [24], [37], [44]. Numa outra perspetiva, ao ser adicionado um CPA não penetrante, existe um efeito sinérgico de atuação, ou seja, uma proteção tanto no meio intracelular como no meio extracelular, o que será vantajoso [45].

Ademais, certos açúcares, como a trealose ou a sacarose, demonstraram ser bons candidatos como CPAs na criopreservação de sistemas biológicos. Contudo, ao permanecerem no meio extracelular, devido à sua incapacidade de atravessar a membrana celular, uma vez que não existem transportadores específicos nas células de mamífero, a sua ação crioprotetora não garante a preservação da integridade funcional e estrutural das células. Consequentemente, são usualmente combinados com CPAs penetrantes, como o DMSO ou glicerol [43], [46].

Estudos recentes demonstraram o efeito sinérgico resultante da combinação de agentes crioprotetores não tóxicos na melhoria dos resultados obtidos, sugerindo que estas combinações podem ser a chave para desenvolver soluções crioprotetoras mais eficazes, sem consequências prejudiciais associadas [21]. Todavia, o DMSO seguido do glicerol, continuam a ser os CPAs escolhidos para a criopreservação de amostras biológicas.

Tabela 1.2 - Principais agentes crioprotetores (CPAs) penetrantes e não penetrantes utilizados na criopreservação.

Tipo de agente crioprotetor	Nome	Função principal
CPAs penetrantes	Dimetilsulfóxido (DMSO)	Previne a formação de cristais de gelo [47]
	Glicerol	Protege a integridade das células durante o congelamento [24], [48]
	Etilenoglicol (EG)	Reduz o ponto de congelamento e previne danos osmóticos [49]
CPAs não penetrantes	Sacarose	Estabiliza as membranas celulares e proteínas durante o congelamento [50]
	Trealose	Estabiliza as membranas celulares e proteínas e evita danos osmóticos [50], [51]

1.2.3.1. Dimetilsulfóxido (DMSO)

Atualmente, o dimetilsulfóxido (DMSO) é considerado o CPA padrão para a criopreservação de amostras biológicas, devido à sua elevada eficácia [37]. Inicialmente, foi usado na preservação de glóbulos vermelhos e espermatozoides, tendo sido aplicado logo depois a inúmeras amostras [37], [52].

O DMSO é composto por um grupo altamente polar e por dois domínios apolares, o que lhe confere solubilidade tanto em soluções aquosas como em soluções orgânicas, e consequentemente várias aplicações distintas [53]. É amplamente utilizado na biologia celular por possuir diversas propriedades, tais como, vasodilatadoras, diuréticas, anti-inflamatórias e bacteriostáticas. *In vitro*, é usado na criopreservação [54].

Além de todas as características anteriormente referidas, o DMSO consegue atravessar a membrana celular de células de mamífero e não só, protegendo as células de lesões associadas ao congelamento e descongelamento, sendo por isso muito usado como agente crioprotetor na criopreservação de células e tecidos para aplicações laboratoriais e clínicas. Adicionalmente, os protocolos convencionais usados na preservação de várias linhas celulares e tecidos, envolvem a sua aplicação como CPA, devido à sua elevada capacidade de restringir a nucleação de gelo e promover a viabilidade celular após o descongelamento [24], [47], [53].

Sendo o DMSO o CPA mais usado atualmente, existem, portanto, protocolos perfeitamente otimizados para a sua aplicação. É geralmente adicionado ao meio celular suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), numa concentração de 10% (v/v) antes do

congelamento, contudo alguns tipos de células podem requerer ajustes nestas concentrações ou a inclusão de outros componentes no meio de criopreservação [24], [55]. Quando adicionado nesta concentração, o DMSO atua aumentando a porosidade da membrana celular, de modo a facilitar o fluxo de água para fora da célula, através da membrana. Deste modo, diminui a quantidade de moléculas de água disponíveis no meio intracelular, o que evita a formação de cristais de gelo [24].

Embora, seja muito eficaz na preservação de amostras biológicas, já foi demonstrado que o DMSO tem um efeito prejudicial na recuperação funcional das células e que induz uma diversidade de reações tóxicas e efeitos adversos, desde ligeiros a graves, tais como, decréscimo respiratório e neurotoxicidade, que são prejudiciais para os pacientes, no contexto de aplicação clínica [47], [55]. Esta situação é muito mais crítica quando a criopreservação é feita por vitrificação, que pressupõe a existência de uma concentração mais alta de CPA, o que aumenta as consequências adversas, pelo que não é aconselhável o seu uso em elevadas concentrações [47].

O efeito citotóxico do DMSO depende da temperatura, do tempo de exposição e da concentração [47]. Estudos demonstraram que o DMSO a temperaturas acima de 0 °C destabiliza as proteínas, enquanto a temperaturas inferiores a 0 °C interage com as proteínas estabilizando-as [23], [56]. Contudo, a temperaturas superiores a 4 °C é considerado citotóxico [55]. Além disso, em concentrações elevadas pode causar alterações na membrana mitocondrial, causando a libertação de eletrões e consequentemente, a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) [23], [54]. Relativamente à membrana celular, tem um impacto negativo na sua estrutura e integridade, ao interagir com as proteínas do citoesqueleto e ao causar a desidratação dos lípidos, que ao perderem água, existe uma diminuição da sua interação com a água, o que pode afetar a fluidez, a permeabilidade e a estabilidade da membrana [47]. Para além disto, o seu uso repetido, mesmo em concentrações que não sejam prejudiciais, pode alterar o perfil epigenético das células, resultando em alterações fenotípicas indesejáveis, como por exemplo, ao interferir com DNA metiltransferases e enzimas que levam à modificação de histonas, em células estaminais humanas, causa variações epigenéticas e redução da sua capacidade pluripotente [47].

Com o objetivo de garantir a total remoção do DMSO, pelas razões anteriormente descritas, foram desenvolvidos protocolos que envolvem diversos procedimentos de lavagem, que incluem processos de agitação e tensão osmótica e/ou mecânica, que também não são benéficos devido à elevada fragilidade das amostras após serem descongeladas, o que leva à perda de um número significativo de células [47].

1.2.3.2. Glicerol

O glicerol é um poliol presente nos organismos vivos, que está envolvido na bioquímica dos ácidos gordos [57]. É utilizado como agente crioprotetor na preservação de linhas celulares, embriões de mamíferos, entre outras amostras biológicas, há décadas, desde a sua utilização no final da década de 1940, como CPA na criopreservação de espermatozoides a temperaturas inferiores a zero (-70 °C). Nesta época, revelou ser eficaz na proteção das células face à rápida formação de cristais de gelo, resultante do processo de congelamento, aumentando

a sua capacidade de sobrevivência [24], [48]. De um modo geral, este agente facilita o fluxo osmótico de água para o meio extracelular durante o congelamento [23].

Na prática clínica, o glicerol é o agente crioprotetor padrão para a criopreservação de hemácias [58]. Contudo, apesar de ser considerado uma molécula que apresenta baixa toxicidade em exposições de curta duração, quando utilizado em elevadas concentrações é considerado tóxico, sendo necessária a sua remoção das células. Esta toxicidade e o seu processo complexo de remoção, designado por desglicerolização, limitam a sua aplicação [58], [59], [60]. Adicionalmente, tem vindo a ser demonstrado que pode danificar alguns tecidos, e a sua eficácia na preservação de tecidos e órgãos humanos de maior dimensão ainda não foi provada [27], [59], [60].

A inclusão de açúcares, como a sacarose e trealose, classificados como CPAs não penetrantes, na solução crioprotetora permite reduzir a concentração deste agente, o que diminui significativamente a toxicidade presente na solução, e consequentemente o seu efeito prejudicial [16]. Adicionalmente, tem vindo a ser descrito que a presença de açúcares na solução de congelamento, tais como os referidos anteriormente, aumenta a viabilidade celular pós-descongelamento, ao estabilizar as membranas celulares e as proteínas durante o congelamento [50].

1.2.3.3. Trealose

A trealose é um dissacarídeo não redutor que se encontra presente na natureza em organismos vivos, desde animais e plantas, a leveduras e bactérias. Atua como fonte de energia e como componente estrutural de membranas bacterianas. Possui um importante papel como osmorregulador e de resposta ao stress durante o processo de desidratação [51], [61]. Estas características associadas ao facto de que, organismos como leveduras, fungos, bactérias ou insetos, conseguem sobreviver por completo ao congelamento, apresentando em comum uma elevada acumulação de açúcares, principalmente trealose, sugerem que a trealose pode ter um importante contributo no congelamento de amostras biológicas [50].

Neste sentido, têm sido realizados estudos a respeito do papel deste dissacarídeo na estabilização de amostras biológicas durante o processo de desidratação e subsequente congelamento, no entanto este mecanismo ainda não está totalmente compreendido [62], [63]. Contudo, já foi demonstrado que a trealose atua eficazmente como agente de resistência face ao congelamento [51]. Adicionalmente, tal como outros açúcares, a trealose consegue ser mantida de forma estável no estado vítreo, com uma temperatura de transição vítrea característica [62].

Relativamente às estratégias alternativas à toxicidade, à semelhança do que foi descrito anteriormente para o glicerol, já vários estudos propuseram a substituição parcialmente ou total do DMSO, por combinações de CPAs não tóxicos, como é o caso dos açúcares, ou por agentes crioprotetores alternativos, como por exemplo Sistemas Eutéticos Profundos (DES), que sejam soluções mais seguras e igualmente eficazes, perspetivando assim um futuro da criopreservação sem a utilização de DMSO, o qual apesar de bastante eficiente no cumprimento do seu propósito, é altamente questionável quanto à sua utilização [21], [43], [47], [64].

1.3. Química Verde e Sistemas Eutéticos Profundos

O progresso do desenvolvimento humano ao longo de várias décadas, tem vindo a danificar visivelmente o planeta e os seus recursos naturais, que estão cada vez mais comprometidos devido à sua sobre-exploração. A solução para ultrapassar algumas destas impactantes questões surge através da utilização de fontes de energia alternativas e da procura de novas opções mais sustentáveis na indústria e na prática laboratorial [65].

A Química Verde, é um conceito que surgiu pela primeira vez no início da década de 1990, para aumentar o desenvolvimento de novos produtos e processos químicos, de forma benéfica para a saúde humana e, que ao mesmo tempo reduzisse o stress ambiental, promovendo um futuro mais sustentável. [65], [66], [67], [68]. É definida como o “design de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e geração de substâncias perigosas”, sendo caracterizada pelo planeamento cuidadoso da síntese química e do design molecular [66].

Este conceito está baseado em 12 princípios fundamentais, que fornecem o suporte para um design sustentável : i) Prevenção de resíduos, ii) Economia de átomos, iii) Síntese química menos perigosa, iv) Conceção de produtos químicos mais seguros, v) Solventes e auxiliares mais seguros, vi) Conceção para eficiência energética, vii) Utilização de matérias-primas renováveis, viii) Redução de derivados, ix) Catalisadores, x) Conceção para degradação, xi) Análise em tempo real para a prevenção da poluição, xii) Química inerentemente mais segura para a prevenção de acidentes [66]. No entanto, apesar destes critérios terem vindo a ser estabelecidos ao longo do tempo, o principal desafio continua a ser encontrar um equilíbrio entre os crescentes requisitos de qualidade dos resultados e os critérios base da química sustentável [68].

A eliminação por completo da utilização de solventes nos procedimentos químicos como solução mais sustentável, é impossível. Por isso, a redução da utilização de solventes prejudiciais ou a sua substituição por opções mais seguras e menos nocivas pressupõe uma solução mais viável. É nesta procura de solventes e sistemas mais verdes que surgem os Sistemas Eutéticos Profundos (DES) [68].

Os DES são uma classe emergente de solventes verdes, que surgiram no início dos anos 2000 como uma alternativa aos líquidos iónicos (ILs), também eles considerados solventes mais sustentáveis, contudo não são frequentemente biodegradáveis, podem ser altamente tóxicos e tem um custo elevado de produção [68], [69], [70], [71], [72]. Apesar de partilharem bastantes características vantajosas com os líquidos iónicos, tais como, a elevada estabilidade térmica, baixa volatilidade, baixas pressões de vapor e polaridade adaptável, os DES, são um grupo independente de substâncias, que combinam a universalidade e as propriedades físico-químicas dos líquidos iónicos com os princípios da Química Verde a um custo de produção mais reduzido [68], [69], [71], [72], [73].

1.3.1. Sistemas Eutéticos Profundos (DES)

Os Sistemas Eutéticos Profundos (DES) são definidos como uma combinação de dois ou mais componentes que, numa razão molar específica, estabelecem interações entre si por ligações de hidrogénio, o que permite ao sistema apresentar uma diminuição do ponto de fusão,

comparativamente aos seus constituintes individuais (figura 1.3). Este fenómeno pode ser explicado pela deslocalização de carga resultante da ligação de hidrogénio entre o dador de ligações de hidrogénio (HBD) e o aceitador de ligações de hidrogénio (HBA) [70], [71], [72], [73].

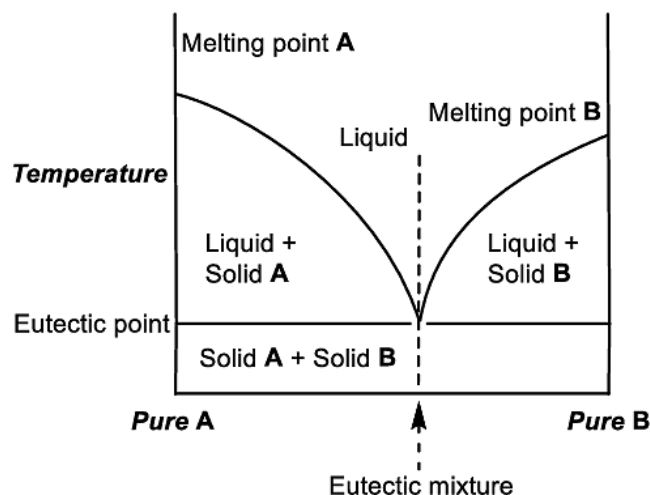


Figura 1.3. Diagrama de fases teórico para um sistema eutético profundo binário [70].

Durante a produção do DES, as interações entre o HBD e o HBA, dão origem a um sistema como uma nova identidade, o qual possui características físicas e químicas diferentes dos seus constituintes individuais. Este sistema depende significativamente da razão molar escolhida, dos seus componentes individuais e das alterações de entropia causadas pelas configurações intermoleculares. As características físicas do DES, tais como, a viscosidade, a densidade, a polaridade, a condutividade e o comportamento térmico, são diretamente influenciadas pela composição do sistema. Por conseguinte, é preciso ter em conta todos estes fatores quando se pretende produzir um DES com propriedades específicas para uma determinada aplicação [74].

O método de preparação dos DES é simples, já que consiste em juntar diretamente dois ou mais compostos até que seja formado um líquido completamente homogéneo. Pode ser necessária alguma agitação e temperatura adequada, contudo não é necessário a adição de nenhum solvente complementar, pelo que não são necessárias etapas de purificação. Além disso, não existe a formação de resíduos ou subprodutos indesejáveis durante a sua produção, o que faz com que o rendimento do processo seja total [69], [70], [72], [73].

Adicionalmente, os DES são solventes personalizáveis, devido à variedade de elementos existentes que os compõem e aos seus arranjos moleculares, o que permite a preparação de um sistema com características únicas e mais apropriadas a uma aplicação específica [21], [72].

O facto de os seus componentes individuais serem bem caracterizados toxicologicamente, nem sempre significa o conhecimento do sistema neste campo. Contudo, os DES apresentam baixa toxicidade celular, mas significativamente dependente da composição e viscosidade do sistema e da sua concentração [72], [73], [75].

Neste sentido, as suas características, como a elevada facilidade de produção e total rendimento do processo, a sua versatilidade de adequação a uma aplicação, a biodegradabilidade dos seus componentes e a sua reduzida toxicidade, fazem dos DES uma ótima alternativa de solventes numa vasta gama de aplicações. [21], [69], [70], [72], [73].

Porém, algumas aplicações recentes relataram a presença de alguma toxicidade nos DES. Assim, para ultrapassar esta barreira, foi proposta a utilização de moléculas de origem natural na sua produção, dando origem aos Sistemas Eutéticos Profundos Naturais (NADES) [73], [76].

1.3.2. Sistemas Eutéticos Profundos Naturais (NADES)

A partir de DES à base de cloreto de colina, por exemplo, uma molécula envolvida em diversas funções biológicas, que estão entre os sistemas formados mais comuns, foram surgindo misturas eutéticas baseadas em metabolitos naturais que se encontram presentes nos organismos [27], [72].

Inspirados na Natureza, Choi *et al* [77] relacionaram a presença natural de moléculas em células vegetais com o seu metabolismo e fisiologia celular e, propuseram que esses compostos existentes nas células em elevadas quantidades, formam um outro tipo de líquido, independente da água e dos lípidos, os chamados NADES. Adicionalmente, Durand *et al* [78] identificou que estes sistemas estão também presentes nas células animais. Estes podem ser encontrados nas células relacionados com processos biológicos, tais como, a biossíntese, solubilização e transporte de vários metabolitos pouco solúveis em água. [27], [78], [79], [80].

Os NADES são constituídos essencialmente por metabolitos primários de origem natural, encontrados comumente em animais e plantas, como ácidos orgânicos, açúcares, polióis ou álcoois de açúcar, aminoácidos ou derivados de colina, e muitas vezes contêm água na sua constituição em determinadas proporções molares. A natureza dos seus componentes torna-os biocompatíveis e, consequentemente pouco tóxicos [27], [73], [80]. Dai *et al* [79] descreveram um elevado número de NADES estáveis.

Caracteristicamente, os NADES são semelhantes aos DES. Adicionalmente, a adição de água nestes sistemas afeta a sua estabilidade e propriedades como, a viscosidade, densidade, polaridade e toxicidade podem ser influenciadas por este fator, alterações causadas pelas fortes ligações de hidrogénio entre os componentes do sistema e a água [27], [73], [80]. A densidade dos NADES é superior à da água, pelo que a densidade do sistema diminui quando se adiciona água [27], [65], [81]. Os NADES, são maioritariamente sistemas polares, contudo a sua polaridade aumenta consideravelmente pela inclusão de ácidos orgânicos nos seus componentes e pela presença de água no sistema [27], [74], [82]. A elevada viscosidade é uma característica inerente destes sistemas, explicada pelas fortes ligações de hidrogénio entre os seus elementos, e consequentemente dependente destes. Esta propriedade representa uma barreira significativa à aplicação destes sistemas. Contudo, verificou-se que a percentagem de água presente no sistema é capaz de alterar a sua viscosidade, reduzindo-a quase à da água com a adição de 25% de água (v/v) [27], [79], [81], [82]. A viscosidade do sistema depende do seu conteúdo de água e da temperatura [65]. Apesar de os NADES apresentarem uma toxici-

dade mais reduzida comparativamente aos DES, devido aos seus constituintes naturais, a introdução de água como componente pode ser vantajosa, pelo facto de diminuir a viscosidade do sistema e, consequentemente diminuir o seu perfil citotóxico [64], [73], [82]. Porém, quantidades de água acima de 30% em alguns casos, e acima de 50%, causam a quebra das ligações de hidrogénio e, consequentemente ruturas intermoleculares e estruturais, destruindo assim as características do sistema [27], [79], [80], [82], [83]. Inferior a este limite, a água presente nos NADES faz parte do sistema e não é suscetível a evaporação [27], [77]. De um modo geral, os NADES possuem um teor em água reduzido ou inexistente, sendo que a percentagem de água afeta diretamente as suas propriedades como explicado anteriormente. Este fator é um parâmetro crítico destes sistemas, que deve ser controlado, de acordo com a sua aplicação [27], [80].

A diversidade de componentes que podem formar um NADES, a versatilidade do sistema e das suas características, as quais podem ser otimizadas e adaptadas para uma determinada aplicação, por fatores como a sua composição, a percentagem de água ou a temperatura, e a sua biocompatibilidade, resultante da natureza dos seus metabolitos, relacionada com a baixa toxicidade e elevada sustentabilidade, torna-os alternativas bastante promissoras, permitindo a sua implementação num vasto leque de aplicações.

Algumas das suas aplicações já descritas incluem por exemplo, a catálise biológica, química orgânica, extração de compostos ativos de plantas com propriedades medicinais, processamento de biomassa, síntese de nanomateriais, estabilização de biomoléculas, genómica e solubilização de produtos farmacêuticos [19], [65], [69], [84]. Porém, com o contínuo desenvolvimento do conhecimento à cerca dos NADES e das suas promissoras propriedades, inúmeras novas aplicações surgirão.

1.3.2.1. NADES como CPA alternativo

A presença de água no meio intracelular é fundamental à vida. Contudo, diversos organismos produzem determinados metabolitos, como açúcares, polióis e aminoácidos, para garantir a sua sobrevivência a temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água, utilizando maioritariamente estratégias de desidratação celular, que levam consequentemente ao aumento destes metabolitos no meio intracelular, resultando num aumento da osmolaridade, redução da água livre disponível e subsequentemente num aumento da viscosidade dos fluidos corporais [19], [27], [73].

A sobrevivência de animais e plantas com esta bioquímica celular, ao adotarem estas estratégias para sobreviver nos seus habitats naturais durante o inverno face a amplitudes térmicas extremas, comprovaram que é possível a manutenção da vida com uma quantidade reduzida de água disponível, ao produzirem certos metabolitos que diminuem significativamente a temperatura de cristalização da água e, que são cruciais à sua sobrevivência neste contexto [19], [27].

A formação de Sistemas Eutéticos Profundos Naturais (NADES) constituídos por estes metabolitos é uma explicação plausível para esta estratégia de sobrevivência natural, sugerindo o seu papel protetor face aos danos causados pelo frio. Neste sentido, compreender melhor o mecanismo protetor que permite a tolerância destes organismos ao frio extremo sem

que haja comprometimento da sua viabilidade e função celular, conjuntamente com uma abordagem inovadora baseada em NADES, permitiu o desenvolvimento de novas técnicas promissoras para criopreservação de células, tecidos e eventualmente órgãos [19], [27], [73]. Com base nesta hipótese, têm vindo a ser realizados diversos estudos que demonstram resultados promissores e a capacidade de determinados NADES atuarem como agentes crioprotetores [21], [27], [43], [64].

De um modo geral, os NADES apresentam estabilidade térmica numa ampla gama de temperaturas, mesmo em valores muito abaixo de 0 °C, o que comprova o seu importante papel na resistência ao frio [37], [79], [81]. Além disso, Craveiro *et al* [74] estudaram o efeito de diversas concentrações de água nas propriedades térmicas de um conjunto de NADES, descobrindo que o aumento do teor em água diminui a temperatura de transição vítrea do sistema, isto é, a temperatura à qual a mistura vitrifica. Este efeito foi comprovado por Castro *et al* [73], nomeadamente para o sistema trealose:glicerol (1:30), no qual o NADES promoveu a vitrificação da água numa ampla gama de temperaturas (-90 °C a 40 °C).

Até ao momento, existem apenas alguns estudos que exploraram a capacidade dos NADES como agentes crioprotetores. Contudo, estudos recentes indicam que os sistemas naturais eutéticos profundos (NADES) são alternativas promissoras para a criopreservação de várias linhas celulares, como L929, HaCaT e Jurkat, demonstrando ser uma opção significativamente menos citotóxica quando comparando com o DMSO, garantindo elevada viabilidade celular após o descongelamento, altas taxas de proliferação celular e morfologia celular normal. Em alguns casos, os NADES superam os resultados obtidos com o DMSO, em particular para queratinócitos (células HaCaT) e células T (células Jurkat) [19], [37], [43], [64], [73], [85].

Castro *et al* [73] utilizando como modelo a linhagem celular L929 (fibroblastos de rato), mostraram que, tal como os CPAs convencionais, o NADES formado por trealose:glicerol na proporção de 1:30 consegue alterar o comportamento térmico da água, evitando a sua cristalização ou reduzindo a temperatura à qual esta cristaliza. Demonstraram ainda que o meio de congelamento das células contendo este sistema a 10% (m/v) apresenta capacidade crioprotetora, com uma tendência semelhante à observada quando se utiliza DMSO. No entanto, quando as células são congeladas apenas com os seus componentes individuais (trealose e glicerol), observa-se uma diminuição progressiva da viabilidade, proliferação e morfologia celular, o que indica um comprometimento das propriedades crioprotetoras, demonstrando o benefício do seu uso combinado enquanto NADES. Além disso, os resultados da viabilidade celular para o sistema trealose:glicerol (1:30) foram superiores aos obtidos com 10% (v/v) de DMSO, o que sugere que a sua utilização como CPA pode diminuir os efeitos tóxicos característicos do DMSO. Estes resultados, em conjunto, evidenciam o elevado potencial deste NADES como CPA na criopreservação de células de mamíferos [73].

Utilizando duas linhas celulares diferentes, L929 e HaCaT, Jesus *et al* [64] avaliaram o potencial de NADES compostos por metabolitos naturais, encontrados em elevada quantidade em animais que vivem em ambientes de frio extremo, como glucose, trealose, prolina e sorbitol, como agentes crioprotetores. Os resultados para a primeira linhagem celular, L929, mostraram que as taxas de viabilidade celular e a morfologia das células após o seu descongelamento com os NADES, são semelhantes aos resultados obtidos com o DMSO (CPA mais

utilizado na criopreservação de células). Nas células HaCaT, mais sensíveis, os NADES proporcionaram maior viabilidade após o descongelamento das células, comparando com o DMSO, apresentando inclusive uma maior proliferação celular, devido à menor toxicidade e ao ambiente rico em açúcares proporcionado por estes sistemas à base de derivados de açúcares. Adicionalmente, os resultados sugeriram que o efeito sinérgico dos constituintes dos NADES é essencial para a eficácia das suas propriedades crioprotetoras, e mostraram a existência de um efeito crioprotetor maior comparativamente ao DMSO a -20 °C, para ambas as linhas celulares. Os dados obtidos corroboram o efeito protetor dos NADES no congelamento de células e apoiam o seu potencial como CPAs alternativos. Além disso, oferecem uma vantagem significativa no processo face à fragilidade apresentada pelas células após serem descongeladas, ao apresentarem baixa toxicidade para duas linhagens celulares diferentes, não necessitando de serem removidos do meio de congelamento.

Todos estes resultados em conjunto destacam e comprovam o potencial dos NADES como um CPA alternativo, menos tóxico e mais sustentável para a criopreservação de células. Todavia, até ao que se sabe no momento não existem estudos relativamente à criopreservação de entidades celulares mais complexas, como tecidos e órgãos utilizando NADES como agente crioprotetor, contudo esta seria, sem dúvida uma perspetiva revolucionária na área da criobiologia.

OBJETIVO

O principal objetivo desta dissertação é explorar a capacidade dos Sistemas Eutéticos Profundos Naturais (NADES) como agentes crioprotetores (CPAs) na criopreservação de entidades celulares superiores, como o tecido cutâneo. Este projeto baseia-se na eficácia já demonstrada pelos NADES na preservação de células de mamíferos em suspensão, como novos CPAs alternativos aos tradicionais, e visa testar a sua aplicação em estruturas celulares mais complexas, como os tecidos, cuja preservação eficaz é um desafio e ainda não foi avaliada com estes sistemas.

Para tal, foram selecionados NADES que apresentaram resultados promissores em estudos prévios com células em suspensão [64], [73] e testados na criopreservação de uma monocamada confluenta de células HaCaT, uma linha celular de queratinócitos humanos, utilizada como modelo experimental. Para atingir este objetivo, foram otimizados protocolos para a obtenção de monocamadas confluentes de queratinócitos, que pretendiam mimetizar o tecido da pele, e avaliou-se a capacidade dos NADES em proteger essa monocamada de células durante o processo de criopreservação.

O estudo pretende investigar se os NADES podem substituir os CPAs tradicionais, como o dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol, cujas toxicidades limitam a sua aplicação na criopreservação de tecidos. Além disso, a viabilidade celular da monocamada de células HaCaT após o processo de congelamento e descongelamento será analisada, com o objetivo de determinar a eficácia dos NADES na preservação da integridade e funcionalidade celular.

A longo prazo, espera-se que este projeto contribua para o desenvolvimento de novas alternativas para o armazenamento eficaz do tecido cutâneo, um tecido muito procurado na medicina regenerativa, cuja preservação adequada ainda representa um grande desafio. Eventualmente, espera-se ainda que este trabalho possa ter um contributo importante na inovação de métodos eficazes de criopreservação de tecidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação dos NADES

Os NADES aplicados neste estudo foram preparados utilizando D-(+)-trealose di-hidratada (Tre, >98.0%, TCI), Glicerol (Gli, 99.5%, Scharlau), D-(+)-glucose anidra (Glu, $\geq 97.5\%$, Farma-Química), Betaína anidra (Bet, $\geq 99\%$, Sigma), D(+)-sacarose (Sac, 99.5%, Sigma). Foram preparadas diferentes misturas eutéticas utilizando estes componentes individuais em diferentes proporções molares, conforme indicado na tabela 3.1, misturando e aquecendo lentamente a mistura entre 35 °C e 60 °C, sob agitação constante, até se obter um líquido homogêneo. Em seguida, os NADES foram deixados a arrefecer à temperatura ambiente, sem agitação.

Tabela 3.1 - Preparação dos NADES.

NADES	Componentes				Rácio Molar	Temperatura
	A	B	C	D		
Tre:Gli	Trealose	Glicerol	-	-	1:30	35 °C - 60 °C
Gli:Glu	Glicerol	Glucose	-	-	4:1	
Bet:Gli:Sac:H ₂ O	Betaína	Glicerol	Sacarose	Água	2:3:1:5	

3.2. DSC

Os ensaios de DSC (Calorimetria Diferencial de Varrimento) foram efetuados num Optical DSC 600 (LINKAM), conectado a uma garrafa térmica como fonte de azoto para controlo da temperatura durante os ensaios. O objetivo foi determinar a temperatura de cristalização (T_c) e de fusão (T_m) dos NADES como componentes de uma solução crioprotetora. Foram preparadas e analisadas soluções de meio de cultura (DMEM + 10% de FBS) com 10%, 15% e 20% (m/v) do NADES composto por trealose e glicerol (1:30), além de 10% (m/v) dos outros dois sistemas em estudo (Gli:Glu e Bet:Gli:Sac:H₂O). Para comparação, também foram analisadas outras duas soluções: uma apenas com meio de cultura (DMEM + 10% de FBS) e outra com meio de cultura (DMEM + 10% de FBS) e 10% (v/v) de DMSO. Todas as amostras, com 9,7

mg cada, foram pesadas e colocadas numa cápsula de safira. Em seguida, foram submetidas a um ciclo de arrefecimento/aquecimento entre -40 °C e 25 °C, realizado a uma taxa de 10 °C/min, com um fluxo de azoto de 80 mL/min. Os eventos térmicos foram obtidos através do software LINK, e os valores da T_c e da T_m foram obtidos a partir dos picos máximos das curvas correspondentes no termograma.

3.3. Cultura e subcultura celular

Neste estudo, foram utilizadas como modelo celular as células HaCaT (CLS – Cell Lines Service), uma linha celular imortalizada de queratinócitos humanos (figura 2.1). As células foram mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM com 4,5 g/L de glucose, L-glutamina e piruvato de sódio, Corning), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, Corning) e 1% (v/v) de penicilina-estrepotomicina (PS, Corning). A cultura celular foi rotineiramente cultivada como monocamada em frascos de cultura de 75 cm² e de 150 cm² (Falcon), até atingirem 80-90% de confluência, numa atmosfera humificada, a 37 °C com 5% de CO₂.

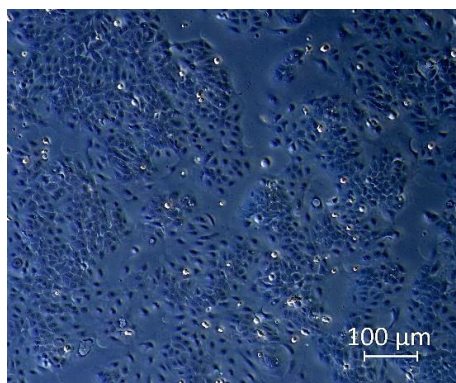


Figura 3.1. Células HaCaT em cultura.

A subcultura das células foi realizada, dissociando-as do frasco através da adição do reagente Accutase® (ref. 25-058-Cl, Corning) por aproximadamente 10 minutos a 37 °C. Seguidamente, foi adicionado meio de subcultura (DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de PS) para neutralizar o efeito da Accutase®. Após isso, a suspensão celular foi centrifugada (601900066, Z 206, Hermle) a 200 g durante 10 minutos; o sobrenadante foi descartado por inversão e as células ressuspendidas em 1 mL de meio de subcultura. Em seguida, as células foram contadas numa câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Tripiano (ref.25-900-Cl, Corning), o qual permite diferenciar células vivas de células mortas (figura 2.2). A concentração celular foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$[\text{Células}] = \frac{\text{número de células contadas}}{\text{número de quadrantes}} \times \text{FD} \times 10^4 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que [Células] é a concentração de células (células/mL) e FD é o fator de diluição utilizado. As concentrações celulares calculadas foram utilizadas em ensaios celulares subsequentes. De acordo com o fator de diluição (FD), as células foram transferidas para o frasco de cultura, após a contagem celular, e incubadas a 37 °C com 5% CO₂.

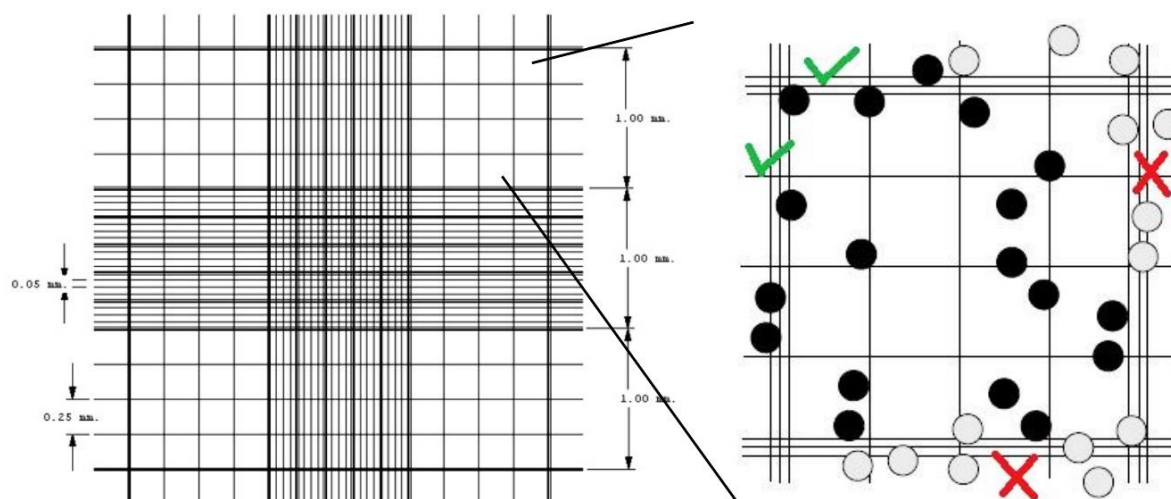


Figura 3.2. Esquema representativo da câmara de Neubauer utilizado na contagem celular.

3.4. Descongelamento das células

As células HaCaT foram descongeladas num banho termostatzado a 37 °C durante 1-2 minutos, com agitação suave. Em seguida, foram transferidas para um tubo falcon contendo 9 mL de meio de cultura. Este foi centrifugado (601900066, Z 206, Hermle) a 200 g durante 10 minutos, e o sobrenadante descartado por inversão. As células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura e transferidas para um frasco de cultura de 25 cm² (Falcon). O frasco foi incubado a 37 °C com 5% CO₂ para garantir a recuperação adequada das células.

3.5. Otimização da densidade celular em placas de 6 poços

De acordo com o objetivo do projeto, foi necessário otimizar a concentração de células/poço em placas de 6 poços para a realização dos ensaios de congelamento planejados. A concentração ótima de células HaCaT por poço para obter uma monocamada confluenta após 3 dias de cultura, já tinha sido previamente otimizada no laboratório para placas de 96 poços (ref. CCPP-096-100, Grynia). Com base nisso, formulou-se a hipótese de que a concentração de células/poço necessária para alcançar a confluência ao fim de 3 dias de cultura seria proporcional à área de crescimento dos poços correspondente a cada placa, tendo por base a concentração otimizada destas células em placas de 96 poços.

Para testar esta hipótese, a concentração de células foi ajustada proporcionalmente à área de crescimento dos poços em diferentes tipos de placas: inicialmente em placas de 24 poços (ref. 3526, Corning), seguidamente em placas de 12 poços (ref. 3513, Corning) e, finalmente, em placas de 6 poços (ref. P21020, ABDOS). A concentração de células por poço utilizada teve como referência a concentração otimizada previamente para placas de 96 poços (ref.

CCPP-096-100, Grynia), a qual teve em consideração a área de crescimento por poço nessas placas. O cálculo das concentrações de células/poço foi feito utilizando a seguinte equação:

$$\frac{\text{Área de crescimento em placas de 96 poços}}{\text{Área de crescimento em placas de 24, 12 e 6 poços}} = \frac{4,5 \times 10^4 \text{ células/poço}}{\kappa} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \kappa = \frac{\text{Área de crescimento em placas de 24, 12 e 6 poços} \times 4,5 \times 10^4}{\text{Área de crescimento em placas de 96 poços}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que κ é a concentração de células/poço correspondente a cada placa, para obter uma monocamada de células confluyente ao fim de 3 dias de crescimento, de acordo com a hipótese estabelecida. Os valores obtidos estão representados na tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Valores de concentração de células/poço obtidos para a otimização do número de células nas diferentes placas (24, 12 e 6 poços), tendo em conta a área de crescimento (poço) corresponde e as características correspondentes em placas de 96 poços, como referência. Os valores das áreas de crescimento (poço) utilizados tiveram por base as especificações descritas nas características das placas fornecidas pela marca.

	Área de crescimento (poço)	Concentração de células/poço
Placas de 96 poços	0,33 cm ²	$4,50 \times 10^4$
Placas de 24 poços	1,9 cm ²	$2,59 \times 10^5$
Placas de 12 poços	3,8 cm ²	$5,18 \times 10^5$
Placas de 6 poços	9,5 cm ²	$1,30 \times 10^6$

Após 3 dias de incubação e com base nos valores de concentração de células/poço obtidos anteriormente, os poços das placas de 24, 12 e 6 poços foram observados ao microscópio (Axio Vert A1, Zeiss), com o intuito de verificar a formação de uma monocamada de células confluyente. Em seguida, foi realizado o ensaio MTS para avaliar a viabilidade celular. Este consistiu em retirar cuidadosamente o meio de cultura dos poços e substituí-lo por uma solução do reagente MTS diluído em meio de cultura (solução a 16 %, com uma diluição de 1:10). As placas foram então incubadas durante 2h30 a 37 °C. Após este período, a absorvância de cada poço foi medida a 490 nm num leitor de microplacas (VICTOR Nivo TM, PerkinElmer, EUA). A viabilidade celular foi expressa como uma percentagem em comparação com as células do controlo, que foram mantidas nas condições normais de cultura celular, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Abs}_{490\text{nm}} \text{ amostra}}{\text{Abs}_{490\text{nm}} \text{ controlo}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

3.6. Avaliação dos tempos de descongelamento

A avaliação do tempo de descongelamento das soluções crioprotetoras (DMEM + 10% FBS + CPAs) foi realizada cronometrando o intervalo de tempo entre a colocação das placas de 24 e 6 poços congeladas, contendo a monocamada de células, numa incubadora a 37 °C e o momento em que os poços com as soluções crioprotetoras utilizadas nos ensaios de congelamento (secção 2.8.1) estavam completamente descongelados.

Adicionalmente, foram realizados outros ensaios, com o intuito de otimizar o tempo no qual as amostras descongelavam. Primeiramente, foram utilizadas placas de Petri (ref. 1.7200201, Normax) nas quais foram colocadas as diferentes soluções crioprotetoras, num volume proporcional ao volume utilizado das mesmas em placas de 24 poços, em que a área do poço é igual a 1,9 cm², de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{\text{Volume de solução p/poço em placas de 24 poços}}{\kappa} = \frac{\text{Área do poço em placas de 24 poços}}{\text{Área das placas de Petri}} \Leftrightarrow$$
$$\Leftrightarrow \kappa = \frac{\text{Volume de solução p/poço em placas de 24 poços} \times \text{Área das placas de Petri}}{\text{Área do poço em placas de 24 poços}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que κ é o volume de solução crioprotetora adicionada a cada placa de Petri. Em seguida, as placas de Petri foram congeladas a -80 °C, no interior de uma caixa de esferovite, por 24 horas. Após este período, foram descongeladas utilizando uma placa de aquecimento a 37 °C, e foi contabilizado o tempo de descongelamento com um cronómetro.

Posteriormente, foi realizado um terceiro ensaio de descongelamento, no qual foi utilizado um orbital shaker (Heidolph Instruments, Unimax 1010, Inkubator 1000) para facilitar o descongelamento das soluções crioprotetoras em placas de 24 e 6 poços. A temperatura usada foi 37 °C e o número de rotações por minuto (rpm) foi 150. O tempo de descongelamento foi contabilizado com um cronómetro.

3.7. Avaliação da citotoxicidade dos NADES

Após a determinação dos tempos de descongelamento das diferentes soluções crioprotetoras contendo os NADES em estudo, foi avaliada a sua citotoxicidade após a sua incubação durante o período correspondente ao seu tempo de descongelamento. Para tal, as células Ha-CaT foram destacadas do frasco de cultura através da adição de Accutase® (ref. 25-058-CL, Corning) e, posteriormente, incubadas durante 72 horas numa placa de 96 poços, a uma densidade de $4,50 \times 10^4$ células/poço, de modo a obter uma monocamada de células confluentes. Em seguida, foram adicionados 5% e 10% (v/v) de DMSO e concentrações diferentes do sistema composto por trealose e glicerol (1:30): 5%, 7,5%, 10%, 15% e 20% (m/v), incubadas durante 5 e 10 minutos a 37 °C e 5% CO₂. Adicionalmente, foram analisadas concentrações de 5% e 10% (m/v) dos sistemas Gli:Glu (4:1) e Bet:Gli:Sac:H₂O (2.3:1:5), incubadas durante 5, 10 e 15 minutos a 37 °C e 5% CO₂. As células de controlo foram incubadas apenas com meio de cultura.

A viabilidade celular foi determinada através do ensaio MTS. Após a exposição às diferentes soluções, adicionou-se 100 µL do reagente MTS diluído em meio de cultura (conforme a Eq. 5) a cada poço. A placa foi incubada durante 2h30 a 37 °C, e após este período, a absorvância de cada poço foi medida a 490 nm num leitor de microplacas (VICTOR Nivo TM, PerkinElmer, EUA). A viabilidade celular foi expressa em percentagem, de acordo com a Eq. 3 (secção 3.5).

$$\text{Volume de reagente MTS} = \frac{\text{Volume final}}{10} \times 0,16 \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que 10 é o fator de diluição e 0,16 é a percentagem da concentração em 100%.

3.7.1. Ensaio MTS

O ensaio de proliferação celular CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), baseado no MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetilxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio), foi utilizado para determinar a viabilidade celular em ensaios de citotoxicidade e de proliferação celular. Este método colorimétrico baseia-se na redução do MTS pelas células metabolicamente ativas, através de enzimas desidrogenases, num produto colorido e solúvel em meio de cultura, designado por formazan (figura 3.3).

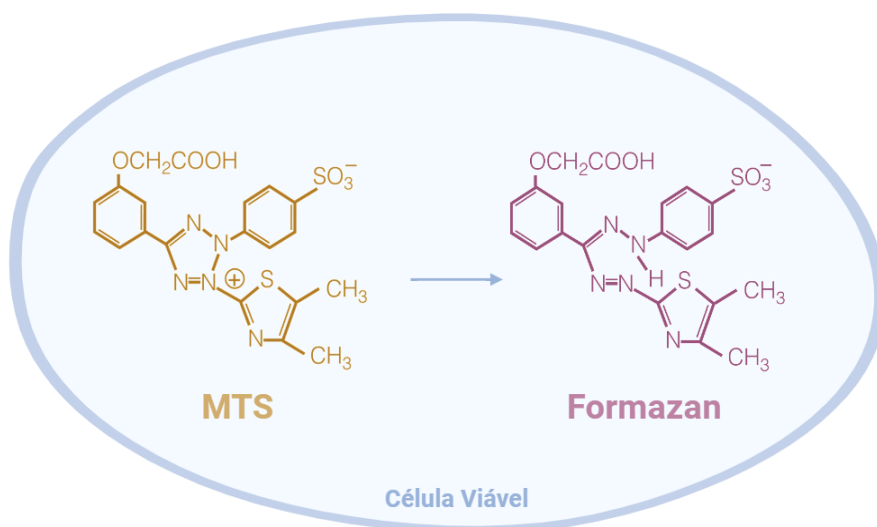


Figura 3.3. Reação química do ensaio MTS em células viáveis. Criado com BioRender.

A quantidade de produto formazan é medida após um período de incubação de 2h30, utilizando um leitor de microplacas a 490 nm. A absorvância medida é proporcional ao número de células viáveis.

3.8. Criopreservação de monocamadas celulares

Após a avaliação da citotoxicidade das soluções crioprotetoras na monocamada de células HaCaT, foram realizados os ensaios de congelamento e descongelamento da monocamada, utilizando os NADES em estudo como CPAs e o DMSO como CPA padrão.

3.8.1. Congelamento de monocamadas celulares em placas

Obteve-se uma monocamada de células totalmente confluyente em cada poço após a cultura das células HaCaT por 72 horas em placas de 6 poços, a uma densidade de $1,30 \times 10^6$ células/poço. Em seguida, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado e substituído por 1,5 mL de alamarBlue™ diluído em meio de cultura (90% de meio de cultura e 10% de alamarBlue™), com o objetivo de avaliar a viabilidade celular da monocamada antes do congelamento. Em seguida, a placa contendo o alamarBlue™ foi incubada por 2 horas a 37 °C e, posteriormente, foi medida a absorvância a 570 nm e 600 nm num leitor de microplacas (VICTOR Nivo™, PerkinElmer, EUA). A quantidade de resazurina reduzida foi determinada em percentagem de acordo com a seguinte equação [86]:

$$\% \text{ resazurina reduzida} = \frac{(117,216 \times \text{Abs}_{570 \text{ nm amostra}}) - (80,586 \times \text{Abs}_{600 \text{ nm amostra}})}{(155,677 \times \text{Abs}_{600 \text{ nm branco}}) - (14,652 \times \text{Abs}_{570 \text{ nm branco}})} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Após a realização do ensaio de viabilidade celular, foi feita uma lavagem com PBS, seguida da adição de 1,5 mL de solução crioprotetora composta por meio de cultura (suplementado com 10% de FBS) e 10% (m/v) dos NADES em estudo (tabela 3.1, secção 3.1). Paralelamente, foi preparada uma solução crioprotetora composta por meio de cultura (igualmente suplementado com 10% de FBS) e 10% (v/v) de DMSO, utilizada como controlo padrão. Após a adição das soluções contendo os CPAs, a placa foi congelada a -20 °C e armazenada a essa temperatura.

Posteriormente, foi realizado um novo ensaio de congelamento em placas de 6 poços, utilizando a mesma densidade celular. À semelhança do ensaio anterior, as soluções crioprotetoras utilizadas eram compostas por meio de cultura (suplementado com 10% de FBS), contudo neste ensaio, foi apenas utilizado um dos NADES em estudo (trealose e glicerol na proporção de 1:30) em diferentes concentrações: 10%, 15% e 20% (m/v), além da solução padrão com 10% (v/v) de DMSO. A temperatura de congelamento foi ajustada para -80 °C.

Adicionalmente, foi realizado um terceiro ensaio de congelamento, utilizando placas de 24 poços, com uma densidade de $2,59 \times 10^5$ células/poço e um volume de trabalho de 500 µL. Foram usadas as mesmas soluções crioprotetoras do segundo ensaio, ou seja, meio de cultura (suplementado com 10% de FBS) e 10%, 15% e 20% (m/v) de Tre:Gli (1:30), juntamente com a solução padrão de DMSO. À semelhança do segundo ensaio, as placas foram congeladas a -80 °C e armazenadas a essa temperatura.

Em todos os ensaios, foi realizada uma observação microscópica (Axio Vert A1, Zeiss) da monocamada de células antes do congelamento.

3.8.1.1. Ensaio alamarBlue™

O ensaio alamarBlue™ (DAL1025-0025, InvitroGen) [86], que utiliza uma solução solúvel em meio de cultura e não tóxica para células viáveis, à base de resazurina, foi utilizado para avaliar a atividade metabólica das células. Este método colorimétrico e quantitativo baseia-se na reação de redução da resazurina, um composto de cor azul e não fluorescente, em resorufina, um produto de cor rosa e fluorescente, que é realizada por células metabolicamente ativas (figura 3.4). É um método vantajoso, particularmente por permitir a realização de ensaios contínuos sem comprometer a viabilidade celular.

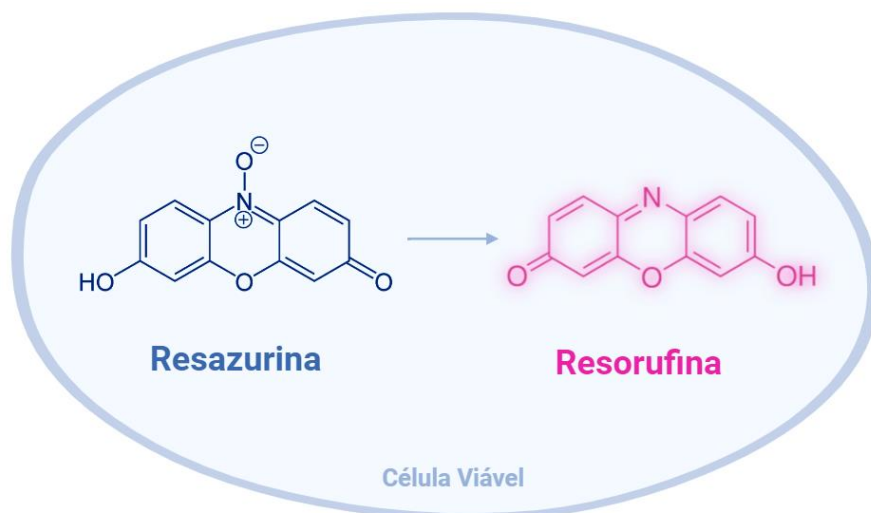


Figura 3.4. Reação química do ensaio alamarBlue™ em células viáveis. Criado com BioRender.

A quantidade de resorufina produzida é quantificada após um período de incubação de 2 horas, utilizando um leitor de microplacas a 570 nm e a 600 nm. A absorvância medida é diretamente proporcional ao número de células viáveis ao refletir a sua atividade metabólica.

3.8.2. Descongelamento de monocamadas celulares em placas

Após o congelamento das placas por um período de 1 semana, foi realizado o protocolo de descongelamento. Este consistiu em retirar a placa do congelador (a -20 °C) ou da arca (a -80 °C), conforme o ensaio de congelamento realizado, e colocá-la numa incubadora a 37 °C até que as soluções presentes nos poços estivessem completamente descongeladas. Em seguida, as soluções crioprotetoras foram retiradas cuidadosamente de cada poço e substituídas pelo reagente alamarBlue™ previamente diluído em meio de cultura (90% de meio de cultura e 10% de alamarBlue™), com o objetivo de avaliar a viabilidade celular da monocamada após o descongelamento. A placa foi incubada durante 2 horas a 37 °C, e a absorvância foi medida a 570 nm e 600 nm utilizando um leitor de microplacas (VICTOR Nivo™, PerkinElmer, EUA). A quantidade de resazurina reduzida foi expressa em percentagem de acordo com a Eq. 6 (secção 3.8.1.).

Uma vez realizado o ensaio de viabilidade celular, o alamarBlue™ foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, no primeiro e segundo ensaio de congelamento/descongelamento, foi adicionado meio de cultura a cada poço, e a viabilidade

celular da monocamada foi avaliada ao longo de 3 dias. Este processo incluiu a adição de meio de cultura após a lavagem com PBS e a incubação da placa a 37 °C com 5% CO₂ por 24 horas entre os ensaios. No último ensaio de congelamento/descongelamento, a viabilidade celular da monocamada foi avaliada apenas no dia do descongelamento, e a placa foi descartada após a medição da absorvância.

Por fim, após a realização do protocolo de descongelamento, foi feita uma observação microscópica da monocamada de células presente nos poços utilizando um microscópio Axio Vert A1 (Zeiss).

3.9. POM

Foram preparadas soluções de meio de cultura (DMEM + 10% de FBS) com diferentes concentrações dos NADES em estudo: 10%, 15% e 20% de Tre:Gli; 10% de Gli:Glu; e 10% de Bet:Gli:Sac:H₂O). Adicionalmente, foi preparada uma solução com 10% (v/v) de DMSO, para comparação. O objetivo foi avaliar a eficácia destes sistemas como CPAs na prevenção da formação de cristais de gelo.

Em seguida, foi colocada uma gota de cada solução à temperatura ambiente em lâminas de vidro. Estas foram congeladas a -80 °C, tendo em conta duas condições: 1) colocadas no interior de um caixa de esferovite e, posteriormente congeladas; e 2) diretamente no congelador a -80 °C.

As amostras foram observadas no modo de transmissão de um microscópio ótico polarizado Olympus BX-53-F2 (Olympus Iberia, Barcelona, Espanha). As imagens foram obtidas através de uma câmara (Olympus SC50) ligada ao microscópio, e o seu tratamento foi realizado com o software Olympus Stream Strat 2.4.2.

3.10. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Califórnia). Os dados apresentados são expressos como média ± desvio padrão (DP), e as diferenças significativas foram determinadas comparando os diferentes grupos de interesse com um grupo controlo. Foram considerados estatisticamente significativos valores de p inferiores a 0,05 (com intervalo de confiança de 95%). As diferenças estatísticas foram representadas por um asterisco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para selecionar os NADES e as concentrações destes a utilizar nas soluções crioprotetoras, foram revistos alguns trabalhos anteriores realizados no grupo. Particularmente relevante é a eficácia dos sistemas enquanto CPAs, bem como a sua reduzida citotoxicidade. Jesus *et al* [64], observaram o potencial crioprotetor de diferentes NADES à base de açúcares em diferentes células, incluindo as células HaCaT, o modelo celular de estudo deste projeto. Os resultados mostraram uma citotoxicidade baixa por parte dos NADES em estudo e elevadas taxas de viabilidade celular e proliferação pós-descongelamento com os NADES a 10% (m/v) em comparação com o congelamento feito com DMSO a 10% (v/v), tendo sido selecionados os sistemas Gli:Glu (4:1) e Bet:Gli:Sac:H₂O (2:3:1:5), entre os mais promissores.

Adicionalmente, Castro *et al* [73] estudaram o efeito crioprotetor do NADES Tre:Gli (1:30) em células L929, uma linha celular que é comumente utilizada em estudos de citocompatibilidade. Os resultados revelaram que este sistema apresentava uma menor citotoxicidade face ao DMSO, numa vasta gama de concentrações (1%, 5%, 10% e 20%), e que as células apresentavam uma resposta e viabilidade celular após o congelamento com 10% deste NADES, semelhante ao congelamento utilizando DMSO, tendo concluindo que existe um efeito crioprotetor no congelamento destas células com Tre:Gli (1:30).

Tendo em conta estes resultados, selecionou-se os NADES apresentados na tabela 3.1 (secção 3.1) a 10% (m/v) para os sistemas Gli:Glu (4:1) e Bet:Gli:Sac:H₂O (2:3:1:5) e a 10%, 15% e 20% (m/v) para o sistema Tre:Gli (1:30).

4.1. Caracterização térmica de misturas DMEM/NADES

Um dos principais problemas da criopreservação de amostras biológicas é o risco de rutura das células pela presença de cristais de gelo no seu interior, pelo que a capacidade de evitar a formação desses cristais formados pela disponibilidade de água no meio intracelular, é fundamental à eficácia de um CPA presente numa solução crioprotetora. As soluções crioprotetoras são maioritariamente compostas por meio de cultura suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e 10% do CPA padrão. O FBS é utilizado neste contexto, por desempenhar um papel crucial como tampão de pressão osmótica e protetor da membrana celular, reduzindo os danos causados pela formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento e descongelamento [87].

Para estudar a influência dos NADES no comportamento térmico da solução crioprotetora, foram preparadas diferentes soluções de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, nas seguintes condições: 1) com 10%, 15% e 20% (m/v) do NADES Tre:Gli (1:30); 2) com 10% (m/v) do sistema Gli:Glu; 3) com 10% (m/v) de Bet:Gli:Sac:H₂O; 4) com 10% (v/v) de DMSO; e 5) apenas com DMEM e 10% de FBS. As soluções foram caracterizadas termicamente por DSC, e os resultados, nomeadamente, os valores das temperaturas de cristalização (T_c) e de fusão (T_m), obtidos a partir dos termogramas (figura A.1 da Informação Suplementar), estão apresentados na tabela 4.1. A figura 4.1 ilustra o perfil da solução de 10% (v/v) de DMSO com meio de cultura suplementado, como um exemplo representativo dos termogramas obtidos para todas as soluções em análise.

Tabela 4.1 - Valores das temperaturas de cristalização (T_c – obtido no valor máximo do pico) e de fusão (T_m – obtido no valor máximo do pico) das misturas de 10%, 15% e 20% (m/v) do NADES Tre:Gli, de 10% (m/v) dos NADES Gli:Glu e Bet:Gli:Sac:H₂O, e de 10% (v/v) de DMSO com meio de cultura suplementado (DMEM + 10% FBS). Os valores para o meio de cultura suplementado também estão indicados.

Solução	T_c (°C)	T_m (°C)
10% Gli:Glu	-25,1	5,2
10% Bet:Gli:Sac:H ₂ O	-20,7	6,3
10% Tre:Gli	-27,7	5,8
15% Tre:Gli	-32,0	2,1
20% Tre:Gli	-32,8	2,5
10% DMSO	-25,9	3,9
10% FBS + 90% DMEM	-21,9	10,2

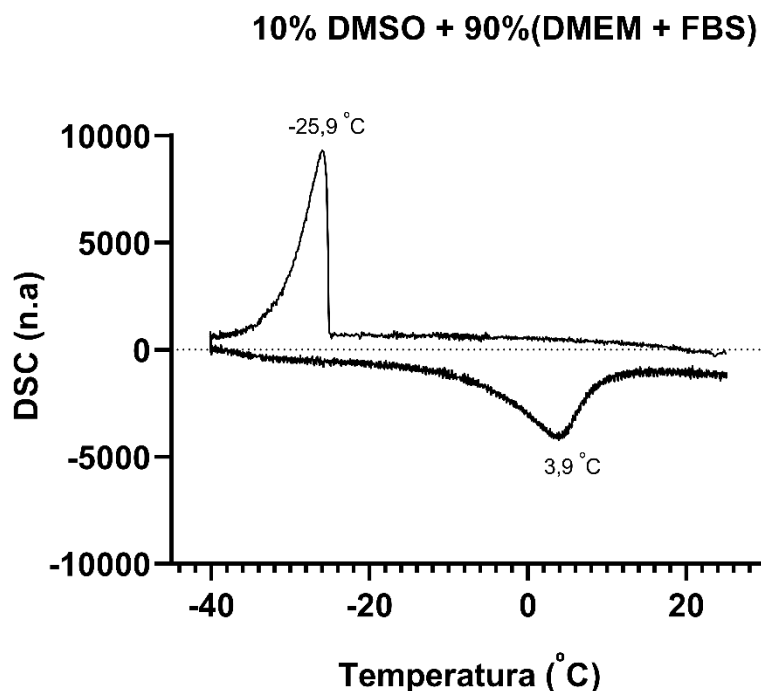


Figura 4.1. Termograma da solução de 10% (v/v) de DMSO com meio de cultura suplementado (DMEM + 10% FBS). Exemplo representativo do perfil termográfico obtido para todas as soluções analisadas.

Com base nos resultados obtidos (tabela 4.1), podemos afirmar que os NADES Gli:Glu e Tre:Gli a 10% (m/v) apresentam uma influência no comportamento térmico da solução controlo, composta por meio de cultura suplementado (10% FBS + 90% DMEM), semelhante à de 10% (v/v) de DMSO, com valores de T_c e T_m muito próximos. Ambos os NADES Gli:Glu e Tre:Gli a 10% e o DMSO a 10% (v/v), conseguem reduzir as temperaturas de fusão e cristalização da solução controlo em aproximadamente 5 °C. Contrariamente, o sistema Bet:Gli:Sac:H₂O a 10% apresenta um efeito térmico distinto da solução com 10% (v/v) de DMSO, com T_c e T_m que diferem em cerca de 5 °C e 3 °C, respetivamente, em relação aos valores obtidos para a solução com DMSO. Este sistema consegue apenas diminuir a temperatura de fusão (T_m) da solução de controlo aproximadamente 4 °C, enquanto que a temperatura de cristalização (T_c) permanece semelhante à da solução sem CPA.

Adicionalmente, o aumento da percentagem de NADES sugere um efeito na diminuição dos parâmetros avaliados, pelo menos no que diz respeito ao sistema Tre:Gli. As soluções que contêm o sistema Tre:Gli a 15% e a 20% (m/v) apresentam um comportamento semelhante entre si, sendo que ambas conseguem diminuir a T_m da solução controlo em cerca de 8 °C, um decréscimo comparativamente maior que o DMSO a 10% (v/v) e que o mesmo sistema a 10% (v/v). Relativamente, à temperatura de cristalização (T_c) mostram igualmente um melhor desempenho comparando com a solução com 10% (v/v) de DMSO e com o mesmo NADES a uma percentagem inferior, conseguindo diminuir este parâmetro em cerca de 10 °C, face à solução de controlo.

A partir destes resultados, é evidente que os NADES em estudo influenciam as propriedades térmicas da solução controlo sem CPA (DMEM + 10% de FBS) e que o comportamento

térmico depende tanto do sistema utilizado como CPA quanto da sua percentagem na solução crioprotetora. Todos os sistemas testados alteram essas propriedades, contudo os sistemas Tre:Gli a 15% e a 20% (m/v) destacaram-se como os mais vantajosos, superando o CPA padrão utilizado em criobiologia, o DMSO, e sugerindo que podem ser opções alternativas eficazes e menos tóxicas. Tal deve-se à sua maior capacidade de reduzir as temperaturas de cristalização (T_c) e fusão (T_m). Ao manter a solução líquida a temperaturas mais baixas, através da redução da T_m , os CPAs evitam a formação cristais de gelo e, ao diminuírem a T_c , atrasam a sua formação, resultando em cristais menores e menos numerosos, o que minimiza os danos celulares e melhora a viabilidade celular após o descongelamento [88].

4.2. Otimização da densidade celular em placas de 6 poços

A densidade celular necessária para obter uma monocamada de células HaCaT em placas de 96 poços, após 3 dias de crescimento, já havia sido previamente otimizada no laboratório. No entanto, o objetivo deste trabalho era cultivar e criopreservar uma monocamada destas células em placas de 6 poços, que possuem uma área de crescimento significativamente maior. Este aumento na área de crescimento das células é importante por permitir a realização da remoção eficaz do tecido cutâneo, mimetizado pela monocamada celular, de modo a possibilitar posteriormente o seu uso. Assim, foi necessário otimizar a densidade celular em placas de 6 poços para garantir a formação de uma monocamada confluenta e funcional.

Para cumprir este objetivo, foi formulada a hipótese de que o aumento da área de crescimento das células nos poços seria proporcional ao aumento da concentração de células colocada em cada poço. Portanto, à medida que a área de crescimento dos poços aumentava devido às características distintas de cada placa de cultura, o número de células necessário para formar uma monocamada confluenta após 3 dias, em condições ótimas de cultura, deveria aumentar na mesma proporção. Esta hipótese baseou-se na concentração já otimizada destas células para as placas de 96 poços.

Para testar a hipótese e determinar o valor ótimo da densidade celular em placas de 6 poços, a concentração de células foi ajustada gradual e proporcionalmente à área de crescimento dos poços, em placas de 24, 12 e 6 poços. Após o tempo de incubação, foi realizado o ensaio MTS para cada condição, com o propósito de avaliar a proliferação celular, e as células foram observadas através do microscópio, de modo a verificar a presença da monocamada. Os resultados obtidos encontram-se representados nas figuras 4.2 e 4.3.

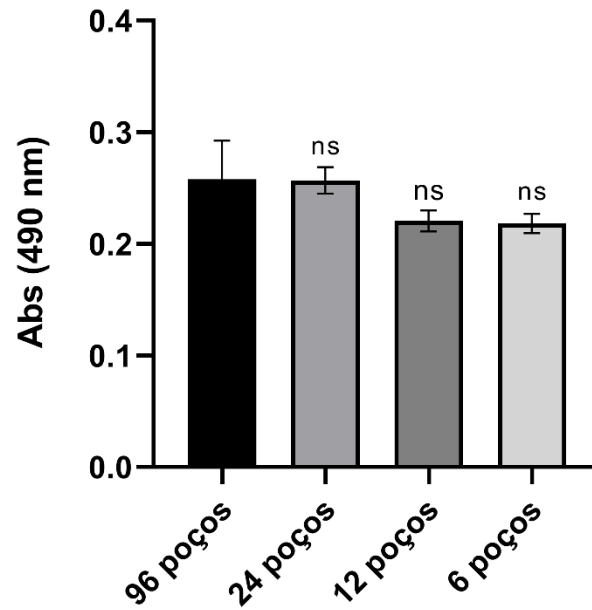


Figura 4.2. Otimização da densidade celular de células HaCaT para obter uma monocamada confluenta em placas de 6 poços. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, com pelo menos 3 replicados. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de comparações múltiplas Tukey's. Nesta análise, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos, que foram representadas como ns.

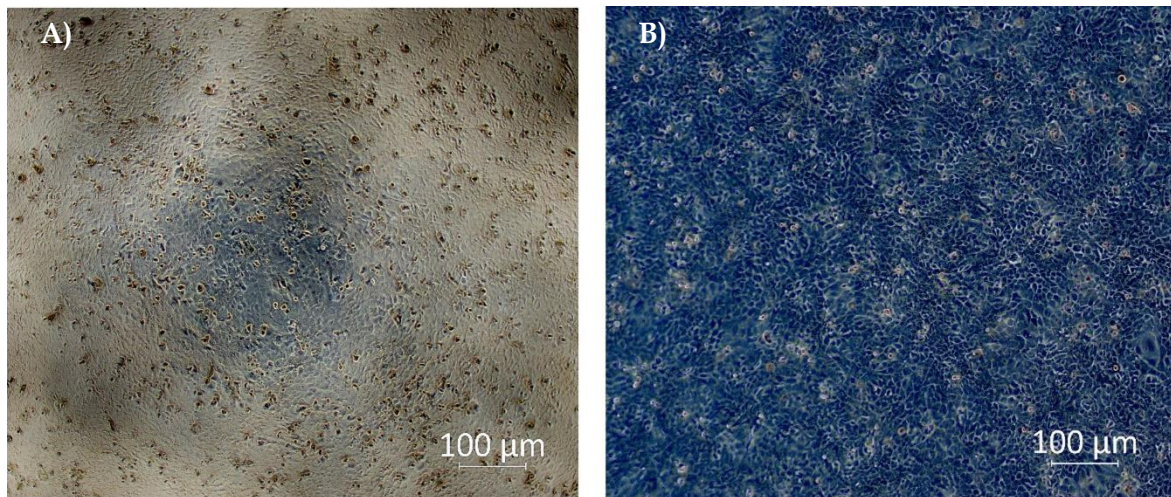


Figura 4.3. Fotografias de uma monocamada de células HaCaT confluenta em placas de 96 poços (A) e em placas de 6 poços (B), obtidas com o microscópio invertido Axio Vert A1 (Zeiss), com escala de 100 μm . As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e incubadas a 37 °C com 5% de CO_2 . A confluência total foi atingida após 72 horas de cultivo.

Os resultados obtidos confirmam a hipótese proposta, uma vez que não existem diferenças estatisticamente significativas nos resultados do ensaio de viabilidade celular realizado entre as diferentes placas, nomeadamente entre as placas de 96 poços (usadas como referência) e as placas de 6 poços, após 3 dias de cultura. Além disso, a observação microscópica complementar revelou que, de forma semelhante ao que foi observado nas placas de 96 poços (figura 4.3.A), onde a concentração de células/poço já havia sido otimizada para $4,50 \times 10^4$, nas placas de 6 poços foi igualmente possível observar a existência de uma monocamada de células HaCaT confluenta ao final do período de incubação experimental, ao inocular a densidade celular otimizada de $1,30 \times 10^6$ (figura 4.3.B). O mesmo foi observado nas placas de 24 e 12 poços, corroborando a eficácia da extrapolação feita. Estes resultados indicam que a metodologia usada, é eficaz para prever a quantidade de células necessária para alcançar a confluência em diferentes áreas de crescimento dos poços.

A ausência de diferenças significativas nos resultados do ensaio MTS indicam que a atividade metabólica das células em monocamada, medida por este ensaio de viabilidade celular, não é influenciada pela área de crescimento dos poços, desde que a densidade celular inoculada seja adaptada. Tal tem um impacto prático considerável, especialmente em estudos que exigem a otimização de protocolos experimentais para diferentes tipos de placas com características distintas, como foi o caso deste projeto.

Contudo, é importante considerar que a extrapolação e metodologia validadas neste estudo são específicas para as condições experimentais testadas, pelo que diferentes tipos de células, meios de cultura ou condições experimentais podem exigir otimizações adicionais. Neste sentido, trabalhos futuros poderiam incluir a validação desta abordagem com outros tipos de células e em diferentes contextos experimentais, como por exemplo, a redução do período de incubação necessário para alcançar a confluência da monocamada. A utilização de métodos adicionais de análise de viabilidade celular, como por exemplo, a coloração com o corante Azul de Tripiano, que distingue células vivas de mortas pela sua coloração, bem como outros métodos que avaliem a apoptose, pode complementar e confirmar os resultados obtidos.

4.3. Avaliação do tempo de descongelamento

O protocolo para a criopreservação de células geralmente exige um descongelamento rápido, realizado colocando o criotubo com células congeladas num banho termostaticado a 37 °C, com agitação, até que o gelo funda [89], [90]. O DMSO, comumente utilizado a 10% como CPA nos protocolos de criopreservação de células, já demonstrou ser citotóxico, o que torna necessário removê-lo rapidamente do meio de criopreservação após o descongelamento [24], [47], [55], [64]. Além disso, a velocidade do descongelamento influencia a viabilidade celular pós-descongelamento, tanto pela possibilidade de recrystalização durante esse processo, onde os núcleos de gelo formados durante o congelamento dão origem a cristais de gelo maiores, como pela exposição prolongada das células a concentrações extracelulares de CPAs que podem ser tóxicas [18], [29], [91].

Para determinar o tempo de descongelamento das diferentes soluções utilizadas no congelamento (DMEM + 10% FBS), contendo as várias percentagens dos NADES em estudo, bem

como do DMSO a 10%, foi contabilizado o tempo decorrido desde o início do descongelamento, ao colocar uma placa de 6 poços congelada com as soluções crioprotetoras numa incubadora a 37 °C, até o momento em que estas estavam totalmente descongeladas. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Tempos de descongelamento das diferentes soluções utilizadas no congelamento (DMEM + 10% FBS), contendo as várias percentagens selecionadas dos NADES e 10% de DMSO. Os tempos foram registados desde a colocação de uma placa de 6 poços com as soluções congeladas numa incubadora a 37 °C até ao seu completo descongelamento.

	Tempo de descongelamento
10% DMSO + 90% (DMEM + 10% FBS)	6 minutos
10% Tre:Gli + 90% (DMEM + 10% FBS)	7 minutos 50 segundos
15% Tre:Gli + 85% (DMEM + 10% FBS)	8 minutos 20 segundos
20% Tre:Gli + 80% (DMEM + 10% FBS)	6 minutos 30 segundos
10% Gli:Glu + 90% (DMEM + 10% FBS)	11 minutos 20 segundos
10% Bet:Gli:Sac:H₂O + 90% (DMEM + 10% FBS)	10 minutos 40 segundos

De acordo com a literatura, criotubos com 1 mL de solução crioprotetora demoram aproximadamente 2 minutos para descongelar de -120 °C num banho termostatzado a 37 °C, com agitação [90]. Neste estudo, foi utilizado um volume de trabalho maior de 1,5 mL de solução, o que pode prolongar o tempo de descongelamento. Apesar disso, a diferença de temperatura entre -120 °C e 37 °C é maior do que entre -80 °C e 37 °C, pelo que seria expectável que o tempo de descongelamento a partir de -80 °C fosse semelhante ao descrito na literatura, ou ligeiramente maior, devido ao aumento do volume. No entanto, os tempos de descongelamento obtidos foram consideravelmente superiores, indicando que as condições experimentais e/ou as propriedades das soluções podem ter impactado negativamente a eficiência do processo de descongelamento.

Quanto às condições utilizadas, a ineficácia do método de descongelamento utilizado pode explicar o aumento do tempo observado. Este método procurou mimetizar o descongelamento em criotubos, contudo foi realizado numa incubadora a 37 °C (ambiente envolvente), sem agitação e sem o contato direto da solução com a fonte de calor, como ocorre num banho termostatzado. Além disso, apesar de ter sido adicionado o mesmo volume de meio de cultura quente (a 37 °C) aos poços antes de colocá-los na incubadora para facilitar o descongelamento, o efeito do frio residual observado entre os poços congelados pode ter superado a influência da temperatura do meio quente. Isto pode ter reduzido a eficácia no aumento da velocidade de descongelamento e, adicionalmente, ter contribuído para o tempo prolongado necessário para descongelar totalmente o dobro do volume de solução.

Relativamente às propriedades das soluções crioprotetoras, uma solução permanece congelada até atingir a sua temperatura de fusão (T_m) e passar ao estado líquido, que no contexto da criopreservação é considerado como o seu descongelamento. De forma geral, soluções com temperaturas de fusão mais baixas requerem uma menor absorção de calor para fundirem, o que se traduz num descongelamento mais rápido. Em contraste, soluções com temperaturas de fusão mais altas necessitam de mais calor para atingir o ponto de fusão, descongelando mais lentamente. Os tempos de descongelamento observados para as soluções crioprotetoras testadas e os seus pontos de fusão, descritos na secção 4.1, estão de acordo com esta tendência.

Em suma, os resultados indicam um aumento considerável no tempo necessário para que as soluções crioprotetoras descongelem completamente, em comparação com o descongelamento de células em criotubos, o que pode ser atribuído às diferenças na metodologia utilizada. Contudo, este aumento não é benéfico, pois prolonga a exposição das células a possíveis fatores de stress, como a recristalização e a toxicidade dos CPAs, que podem comprometer a sua viabilidade pós-descongelamento. Numa perspetiva futura, uma análise mais detalhada dos fatores referidos poderá contribuir para otimizar o processo, no sentido de diminuir o máximo possível este tempo, minimizando os fatores de risco associados.

4.4. Avaliação da citotoxicidade dos NADES

Os tempos de descongelamento observados e discutidos anteriormente para as soluções crioprotetoras em estudo foram significativamente longos, o que levanta preocupações sobre a prolongada a exposição das células a condições adversas, como a possível toxicidade dos CPAs, que pode comprometer a viabilidade celular durante esse período. Assim, determinar o perfil citotóxico destas soluções durante os tempos de descongelamento observados, é crucial para determinar se os CPAs em estudo não condicionam por si só a viabilidade celular pós-descongelamento. Para isso, a citotoxicidade das diferentes soluções crioprotetoras em estudo foi avaliada *in vitro* nas células HaCaT, após 3 dias de cultura em placas de 96 poços.

A citotoxicidade das soluções com 10%, 15% e 20% (m/v) do NADES Tre:Gli e com 10% (v/v) de DMSO foi avaliada para tempos de exposição de 5 e 10 minutos, uma vez que essas soluções apresentaram tempos de descongelamento superiores a 5 minutos e inferior a 10 minutos (tabela 4.2 da secção 4.3). Em contraste, as soluções com 10% (m/v) dos sistemas Gli:Glu e Bet:Gli:Sac:H₂O, que tiveram tempos de descongelamento superiores a 10 minutos e inferiores a 15 minutos, foram avaliadas também para 15 minutos de exposição. As concentrações de NADES e DMSO avaliadas foram determinadas pela concentração inicial dos CPAs na solução crioprotetora antes do congelamento: 10%, 15% e 20% (m/v) para o NADES Tre:Gli, 10% (m/v) para os sistemas Gli:Glu, Bet:Gli:Sac:H₂O e 10% (v/v) DMSO. Durante o processo de descongelamento, descrito na secção 3.6, é feita uma adição de 1,5 mL de meio de cultura, pelo que as concentrações finais são 5%, 7,5% e 10% (m/v) no caso das soluções com Tre:Gli e 5% nas restantes soluções. O perfil citotóxico das soluções presentes nestas concentrações também foi avaliado.

Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas figuras 4.4, 4.5 e 4.6.

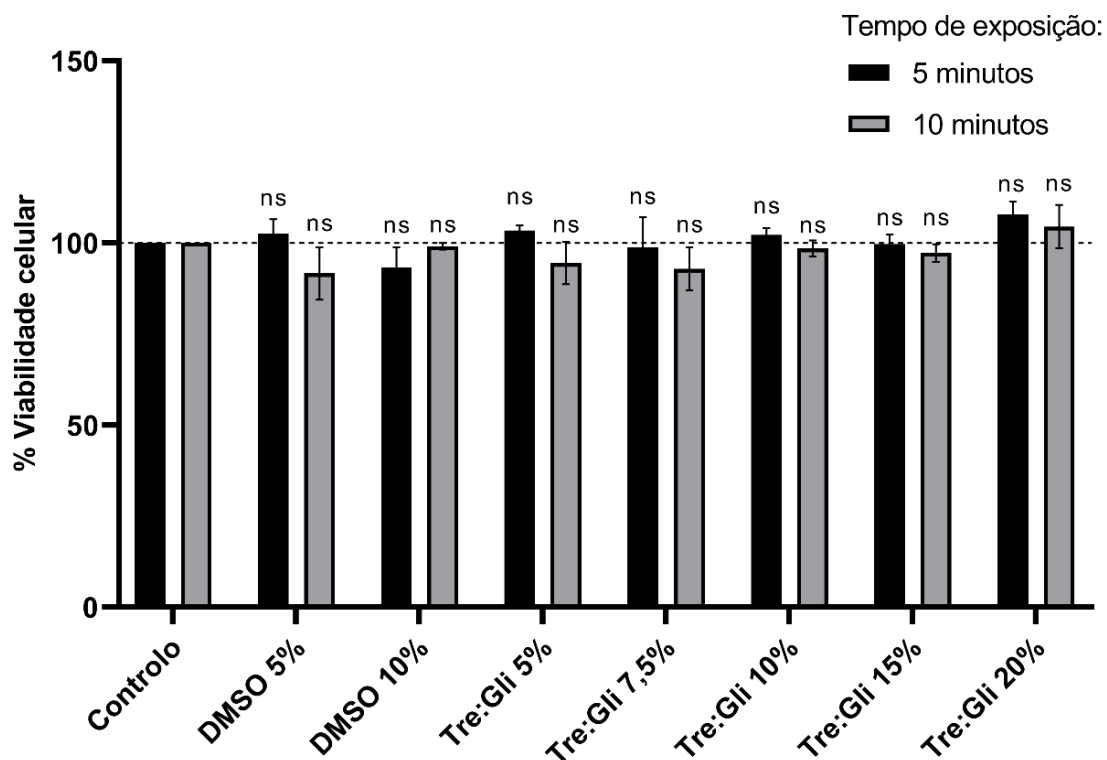


Figura 4.4. Viabilidade celular em células HaCaT após 5 e 10 minutos de incubação com diferentes concentrações de DMSO e do NADES Tre:Gli. O controlo é composto apenas por células HaCaT cultivadas em meio de cultura. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de comparações múltiplas Two-way ANOVA. Nesta análise não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos diferentes grupos quando comparados com o controlo, representadas por ns.

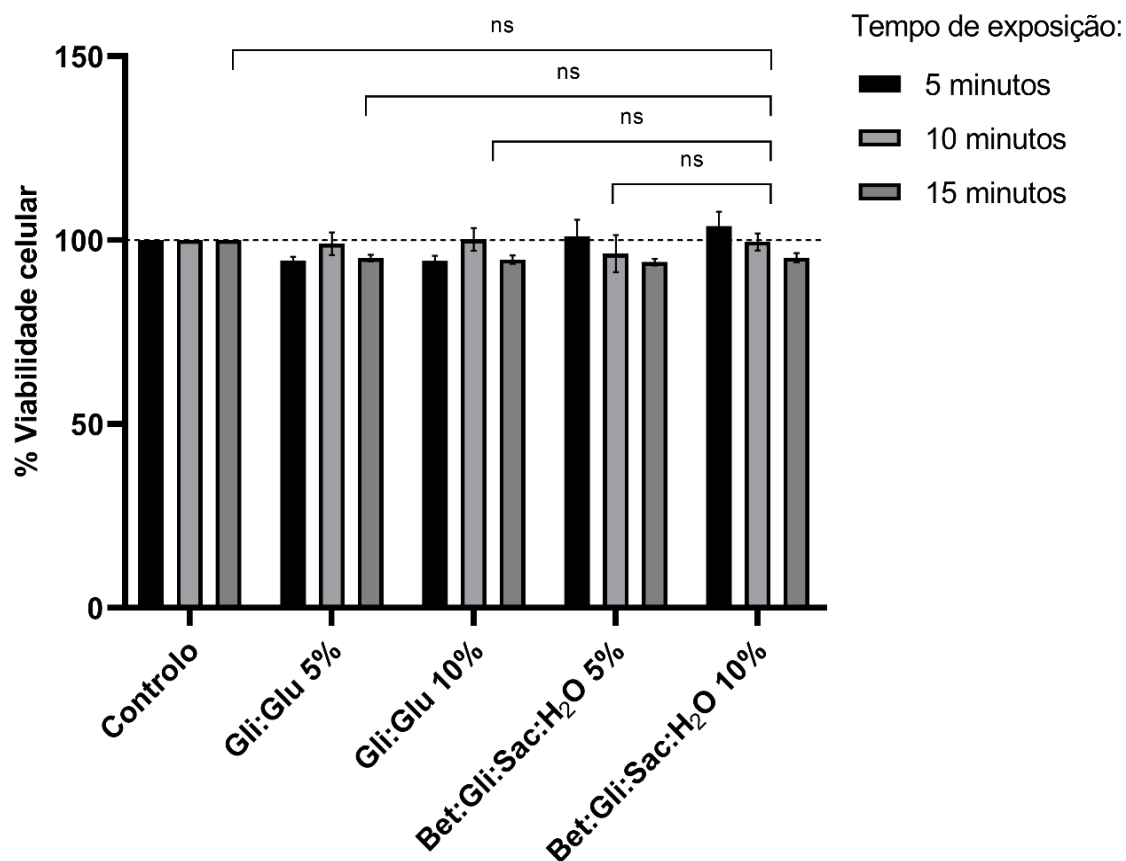


Figura 4.5. Viabilidade celular em células HaCaT após 5, 10 e 15 minutos de incubação com diferentes concentrações dos NADES Gli:Glu e Bet:Gli:Sac:H₂O. O controlo é composto apenas por células HaCaT cultivadas em meio de cultura. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de comparações múltiplas Two-way ANOVA. Nesta análise não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos, representadas por ns.

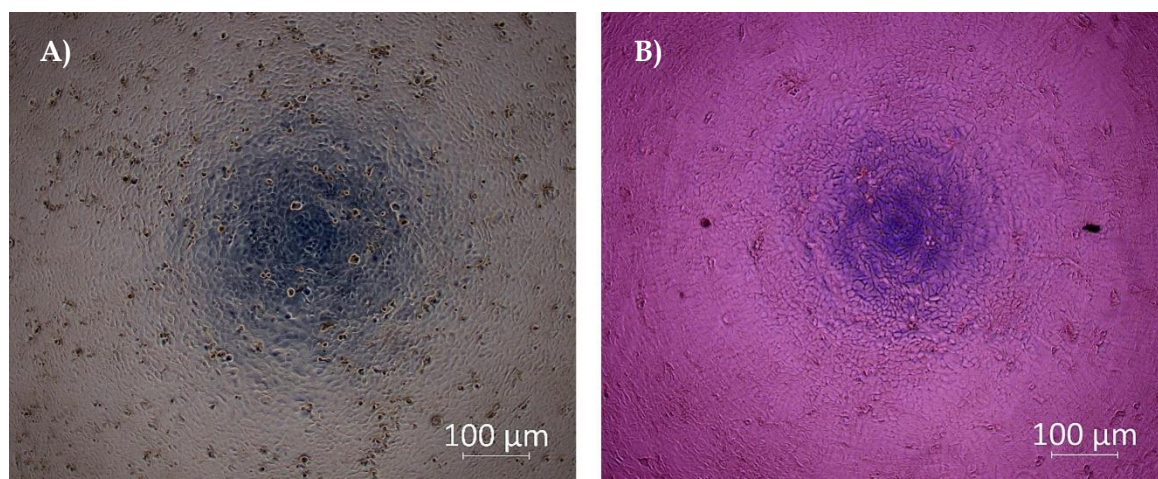


Figura 4.6. Fotografias representativas da monocamada de células HaCaT confluentes em placas de 96 poços antes da exposição a diferentes concentrações de DMSO e dos NADES em estudo (A) e após essa exposição durante o período experimental definido (B), obtidas com o microscópio invertido Axio Vert A1 (Zeiss), com escala de 100 μ m.

Os resultados obtidos revelaram padrões semelhantes de viabilidade celular após a exposição às diferentes soluções crioprotetoras nos tempos de incubação de 5, 10 e 15 minutos. A exposição das monocamadas celulares às soluções com DMSO (5% e 10%) (v/v) e com o sistema Tre:Gli (5%, 7,5%, 10%, 15% e 20%) (m/v) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular em comparação com o controle (100%) nos tempos de exposição de 5 e 10 minutos (figura 4.4). Da mesma forma, nas soluções com os NADES Gli:Glu e Bet:Gli:Sac:H₂O, em concentrações de 5% e 10%, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nem entre os grupos de amostras avaliados nos diferentes tempos de exposição, nem entre os tempos de exposição para a mesma amostra (figura 4.5).

Estes resultados indicam que tanto as soluções com DMSO quanto as com os NADES (Tre:Gli, Gli:Glu e Bet:Gli:Sac:H₂O), não causaram alterações significativas na viabilidade celular da monocamada nos tempos de exposição testados (5, 10 e 15 minutos). Tais resultados são relevantes, pois demonstram que estas soluções, nas concentrações utilizadas, não comprometem a viabilidade celular da monocamada, indicando que não apresentam citotoxicidade nos tempos de descongelamento anteriormente determinados. Dessa forma, eliminam a existência de possíveis problemas de citotoxicidade destes sistemas durante o descongelamento.

Apesar da ausência de efeitos citotóxicos observados nas soluções com DMSO, é importante salientar que a toxicidade do DMSO depende do tempo de exposição e da concentração utilizada. Além disso, o seu uso repetido, mesmo em baixas concentrações, pode causar efeitos adversos na recuperação funcional das células e induzir uma variedade de efeitos tóxicos, descritos na literatura [47]. A presente análise foi realizada num período curto de exposição, o que pode justificar a ausência de alterações significativas na viabilidade celular com o uso de DMSO.

Alternativas igualmente eficazes e menos tóxicas que o DMSO permitiriam preservar mais tipos de células e até tecidos [64]. Neste sentido, os sistemas Tre:Gli (1:30), Gli:Glu (4:1) e Bet:Gli:Sac:H₂O (2:3:1:5), já reportados na literatura como sistemas que apresentam baixa citotoxicidade [64], [73], destacam-se como alternativas menos tóxicas e, eficazes na manutenção da viabilidade celular nas condições testadas.

Adicionalmente, como representado na figura 4.6, a monocamada de células HaCaT permaneceu confluenta antes e depois da exposição às diferentes soluções contendo os NADES (Tre:Gli, Gli:Glu e Bet:Gli:Sac:H₂O) e o DMSO, em todas as condições testadas, indicando que a integridade da monocamada não foi comprometida e, conseqüentemente a viabilidade celular também foi mantida.

4.5. Criopreservação da monocamada de células HaCaT utilizando os NADES como CPAs

Uma vez estabelecido o perfil citotóxico das soluções crioprotetoras destinadas à criopreservação da monocamada de células HaCaT, cuja densidade celular já foi otimizada neste estudo para placas de 6 poços, procedemos a avaliar o potencial dos NADES como CPAs.

No primeiro ensaio de congelamento, a monocamada de células HaCaT foi preparada em placas de 6 poços e congelada a -20 °C, utilizando os diferentes meios de congelamento à base de soluções de meio de cultura (DMEM) suplementado com FBS. Optou-se por congelar a placa a -20 °C com base num estudo anterior [64], no qual relataram resultados promissores na criopreservação de células HaCaT em suspensão a essa temperatura, utilizando NADES como CPAs. Esta abordagem pode ser vantajosa, pois não exige o uso de uma arca a -80 °C, tornando o processo mais acessível e simples. Nesta primeira fase do procedimento, foram adicionados às soluções de 90% (v/v) de DMEM + 10% (v/v) FBS, os três NADES em estudo (Tre:Gli, Gli:Glu e Bet:Gli:Sac:H₂O) a 10% (m/v), a concentração comumente usada de CPA em protocolos convencionais, e 10% (v/v) de DMSO [24], [55].

A viabilidade celular foi avaliada antes do congelamento da monocamada em placas de 6 poços, utilizando os NADES como agentes crioprotetores e o DMSO como referência. A avaliação foi repetida após o descongelamento, realizado na incubadora a 37 °C, ao longo de três dias consecutivos. O objetivo desta análise ao longo do tempo foi observar a evolução da monocamada de células HaCaT e a sua capacidade de recuperação após o processo de criopreservação. Para isso, utilizou-se o ensaio de viabilidade celular alamarBlue™ (descrito na secção 3.8.1.1), que mede a quantidade de resazurina reduzida por células metabolicamente ativas, permitindo inferir a viabilidade celular das mesmas. Neste caso, optou-se pelo ensaio alamarBlue™ por permitir a realização de avaliações contínuas da viabilidade celular sem comprometer a mesma [86]. Os resultados deste primeiro ensaio estão apresentados nas figuras 4.7 e 4.8.

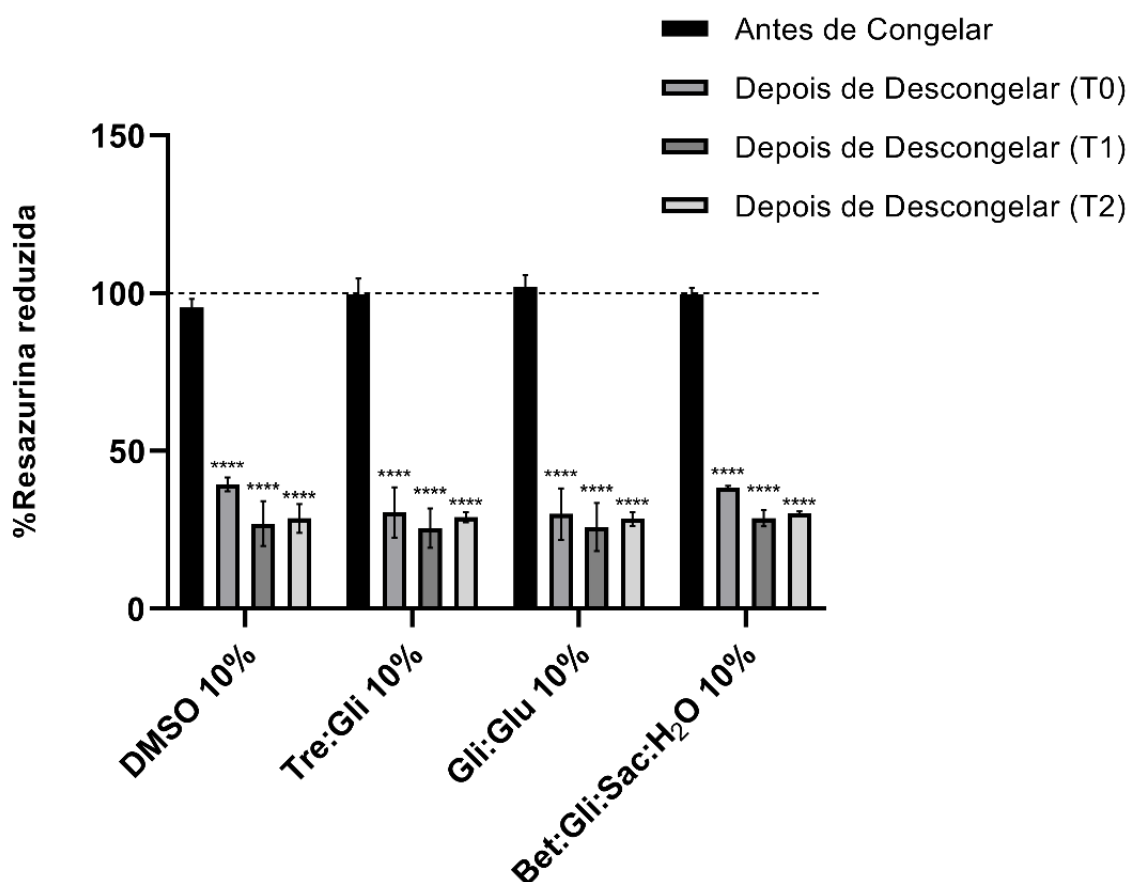


Figura 4.7. Quantidade de resazurina reduzida (%), obtida através do ensaio de viabilidade celular alamarBlue™ em placas de 6 poços, antes do congelamento da monocamada de células HaCaT; e após uma semana, no dia em que foi descongelada (T0) e nos 2 dias seguintes (T1 e T2). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão (n=3). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste Dunnett's para comparações múltiplas entre o momento antes do congelamento e após o descongelamento (T0, T1 e T2), para cada CPA em análise (10% DMSO, 10% Tre:Gli, 10% Gli:Glu e 10% Bet:Gli:Sac:H₂O), e estão representadas em asteriscos: ****p<0,0001, Two-way ANOVA.

Os resultados obtidos indicam uma redução acentuada na viabilidade celular, medida pelo ensaio alamarBlue™ através da percentagem de resazurina reduzida pelas células metabolicamente viáveis (figura 4.7). Esta diminuição foi observada ao comparar os valores de resazurina reduzida antes do congelamento da monocamada celular, os quais rondavam os 100%, com os valores obtidos após o descongelamento nos três dias de análise (T0, T1 e T2), que diminuíram para cerca de 20%-30%. Foram identificadas diferenças estatisticamente significativas (****p<0,0001) entre os valores após o descongelamento e aqueles obtidos antes do congelamento, para todos os grupos testados (NADES e DMSO).

Esta redução na viabilidade celular pode ser explicada por danos celulares causados durante o processo de congelamento e/ou descongelamento, nomeadamente a formação de cristais de gelo intracelulares, a qual é mais suscetível acontecer em monocamadas de células face a células em suspensão [92]; choque osmótico resultante da adição das soluções crioprotetoras; choque térmico causado pela inexistência de um controlo adequado na taxa de arrefecimento, controlo que acontece quando se utiliza um CoolCell na criopreservação de células em suspensão, o qual é ideal para reduzir possíveis danos celulares; e recristalização durante

o período de descongelamento, devido à pouca eficácia do método usado, relacionada com o tempo de descongelamento, anteriormente discutido na secção 4.3.

O facto de a monocamada criopreservada com os NADES ter mostrado uma redução significativa na viabilidade, semelhante à observada com o DMSO, que é conhecido pela sua eficácia como CPA, apesar dos efeitos negativos associados, sugere que os danos causados durante o processo não puderam ser evitados pela proteção destes compostos. Além disso, a avaliação da viabilidade ao longo do tempo após o descongelamento revelou que não houve uma recuperação substancial da viabilidade da monocamada celular, o que indica que os danos causados durante o processo podem ser irreversíveis, pelo menos no período experimental considerado.

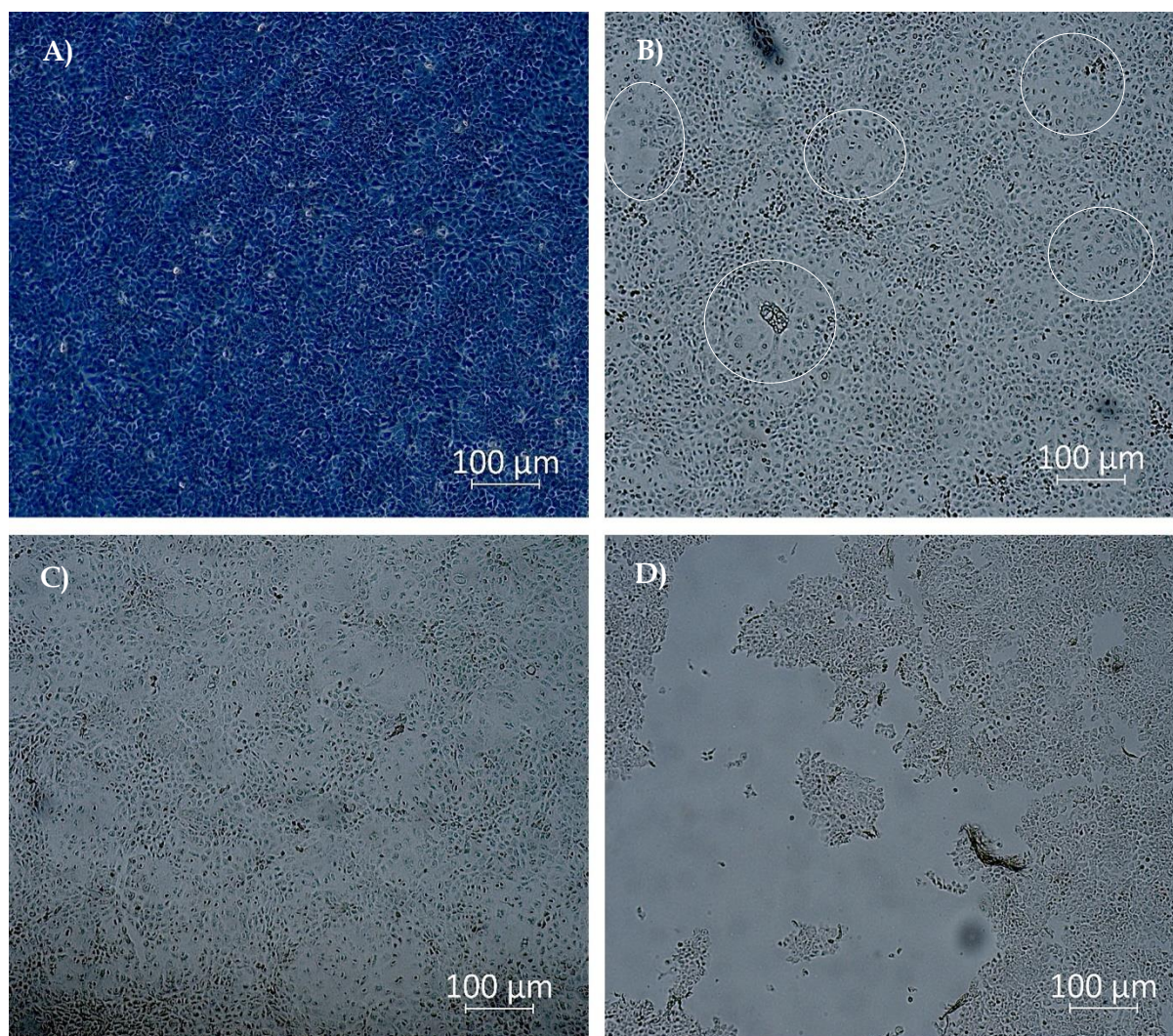


Figura 4.8. Fotografias representativas das diferentes etapas do processo de criopreservação a -20°C da monocamada de células HaCaT em placas de 6 poços. As imagens obtidas com o microscópio invertido Axio Vert A1 (Zeiss), com escala de $100\text{ }\mu\text{m}$, ilustram a evolução da monocamada ao longo do tempo: A) antes do congelamento, B) imediatamente após o descongelamento (T0), C) 1 dia após o descongelamento (T1), e D) 2 dias após o descongelamento (T2). Esta figura refere-se ao congelamento utilizando a solução crioprotetora com 10% de Tre:Gli.

A análise da observação microscópica apresentada na figura 4.8, que ilustra um exemplo representativo do que foi observado com todas as soluções crioprotetoras, inclusive com a solução contendo 10% de DMSO, ilustradas na figura A.2 da Informação Suplementar, mas referente à solução com 10% de Tre:Gli, revela uma quebra progressiva da monocamada de células HaCaT, evidenciada pelo destacamento das células. Este fenómeno é evidente logo após o descongelamento (figura 4.8), onde se observa a ausência de uma monocamada de células coesa (assinalada em algumas zonas na figura 4.8 B), em contraste com o que foi observado antes do congelamento (figura 4.8 A). As células, após o descongelamento, começaram a destacar-se da placa e a ficar em suspensão, sendo removidas posteriormente durante os procedimentos práticos de manutenção nos dias subsequentes, motivo pelo qual se observa um aumento progressivo dos espaços sem células, observados nas fotografias do mesmo local do poço, ao longo dos dias, em particular no último (figura 4.8 D). Este destacamento das células logo após o descongelamento corrobora a redução significativa da viabilidade celular, pois, embora as células estivessem presentes inicialmente (figura 4.8 B e C), não estavam viáveis, ficando em suspensão no meio, o que resultou na sua inevitável remoção, observada na figura 4.8 D. A perda de adesão celular e a subsequente desintegração da monocamada indica que o processo de criopreservação, mesmo com o uso do DMSO ou NADES como CPAs, comprometeu severamente a integridade estrutural das células HaCaT. A incapacidade das células de manterem a adesão e a coesão após o descongelamento indica danos irreversíveis na membrana celular e nas junções intercelulares, levando à fragmentação visível da monocamada ao longo do tempo. Estes resultados destacam a necessidade de otimização das condições de criopreservação usadas, de modo a minimizar os danos celulares e preservar a viabilidade da monocamada.

Neste sentido, foi realizado um segundo ensaio de congelamento da monocamada de células HaCaT em placas de 6 poços, no qual foram ajustadas algumas condições no protocolo para melhorar o processo de criopreservação. A temperatura de congelamento foi ajustada para -80 °C, uma temperatura considerada mais adequada para a preservação bem-sucedida de células, e o congelamento da placa foi feito no interior de uma caixa de esferovite, com o intuito de controlar melhor a taxa de arrefecimento. Além disso, optou-se por utilizar apenas um dos NADES em estudo, o Tre:Gli, um sistema bem conhecido no laboratório, testando concentrações de 10%, 15% e 20%, para avaliar se a concentração inicial era suficiente para uma proteção eficaz. O aumento da concentração do sistema foi realizado com base na garantia de que não eram tóxicas (secção 4.4) e nos resultados promissores obtidos na análise da performance deste sistema como CPA na solução crioprotetora por DSC (secção 4.1). O DMSO a 10% manteve-se como controlo. O objetivo deste segundo ensaio foi avaliar se estas alterações conseguem mitigar os danos observados anteriormente e promover uma recuperação da monocamada celular após o descongelamento. A comparação dos resultados deste ensaio com os do primeiro fornecerá informações sobre a eficácia das novas condições e ajudará a otimizar o processo de criopreservação das células HaCaT em monocamada. Os resultados do segundo congelamento encontram-se apresentados nas figuras 4.9 e 4.10.

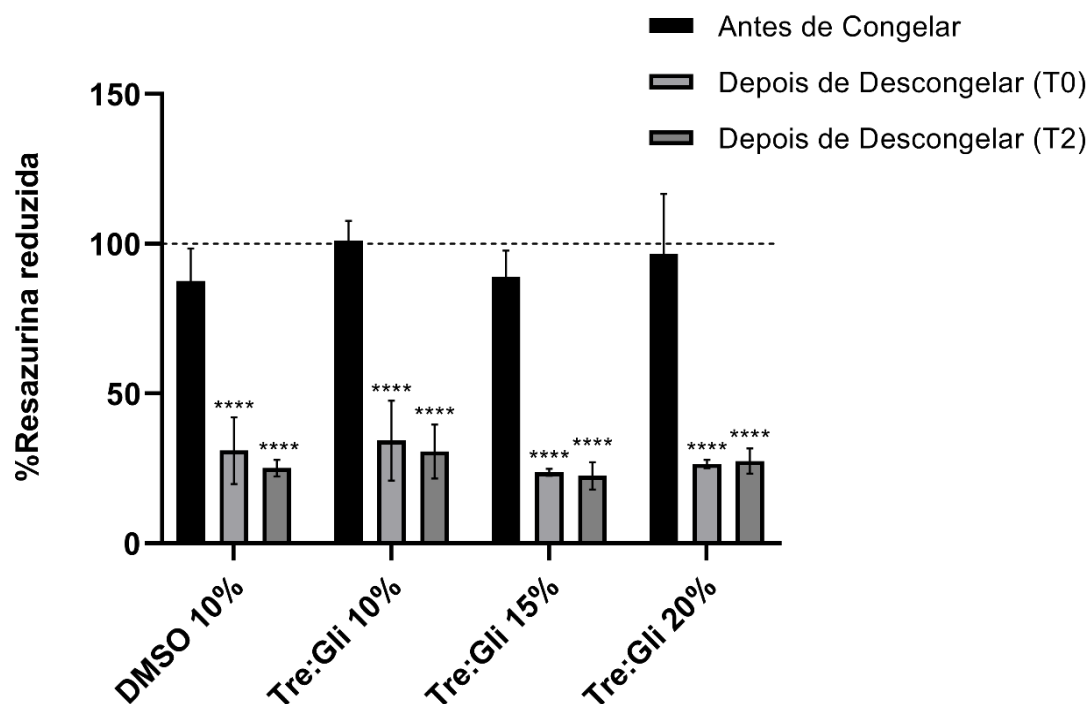


Figura 4.9. Quantidade de resazurina reduzida (%), obtida através do ensaio de viabilidade celular alamarBlue™ em placas de 6 poços, antes do congelamento da monocamada de células HaCaT; e após uma semana, no dia em que foi descongelada (T0) e 2 dias após o descongelamento (T2). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste Tukey's para comparações múltiplas entre o momento antes do congelamento e após o descongelamento (T0 e T2), para cada CPA em análise (DMSO a 10% e Tre:Gli a 10%,15% e 20%), e estão representadas em asteriscos: **** $p<0,0001$, Two-way ANOVA.

Os resultados obtidos no segundo ensaio de congelamento das células HaCaT em monocamada revelaram-se semelhantes aos do primeiro ensaio, apesar das otimizações implementadas ao protocolo. Mesmo com a redução da temperatura de congelamento para -80°C , uma condição geralmente considerada mais eficaz para a manutenção da viabilidade celular, e o aumento da concentração do NADES Tre:Gli para 15% e 20%, não se observou uma melhoria significativa na viabilidade celular após o descongelamento face ao ensaio anterior. Assim, tal como no primeiro ensaio, a viabilidade celular, avaliada pelo ensaio alamarBlue™, apresentou uma redução acentuada logo após o processo de descongelamento, mantendo-se entre 20% a 30% no primeiro dia e após dois dias (T0 e T2), com diferenças estatisticamente significativas (**** $p<0,0001$) em comparação com a viabilidade celular antes do congelamento, para todas as condições testadas (10% DMSO e 10%,15% e 20% Tre:Gli) (figura 4.9). Neste ensaio, a viabilidade não foi avaliada no primeiro dia após o descongelamento (T1), uma vez que no primeiro ensaio não foram observadas diferenças nesse período. No entanto, a avaliação dois dias após o descongelamento (T2) manteve-se para verificar se existia recuperação celular com as otimizações realizadas. As imagens da monocamada neste ensaio também confirmaram a desintegração progressiva da monocamada ao longo do tempo, com perda de adesão e fragmentação da monocamada, particularmente evidente nas imagens ao longo do

tempo (figura 4.10 e figura A.3 da Informação Suplementar), semelhantes às observação feitas no primeiro ensaio.

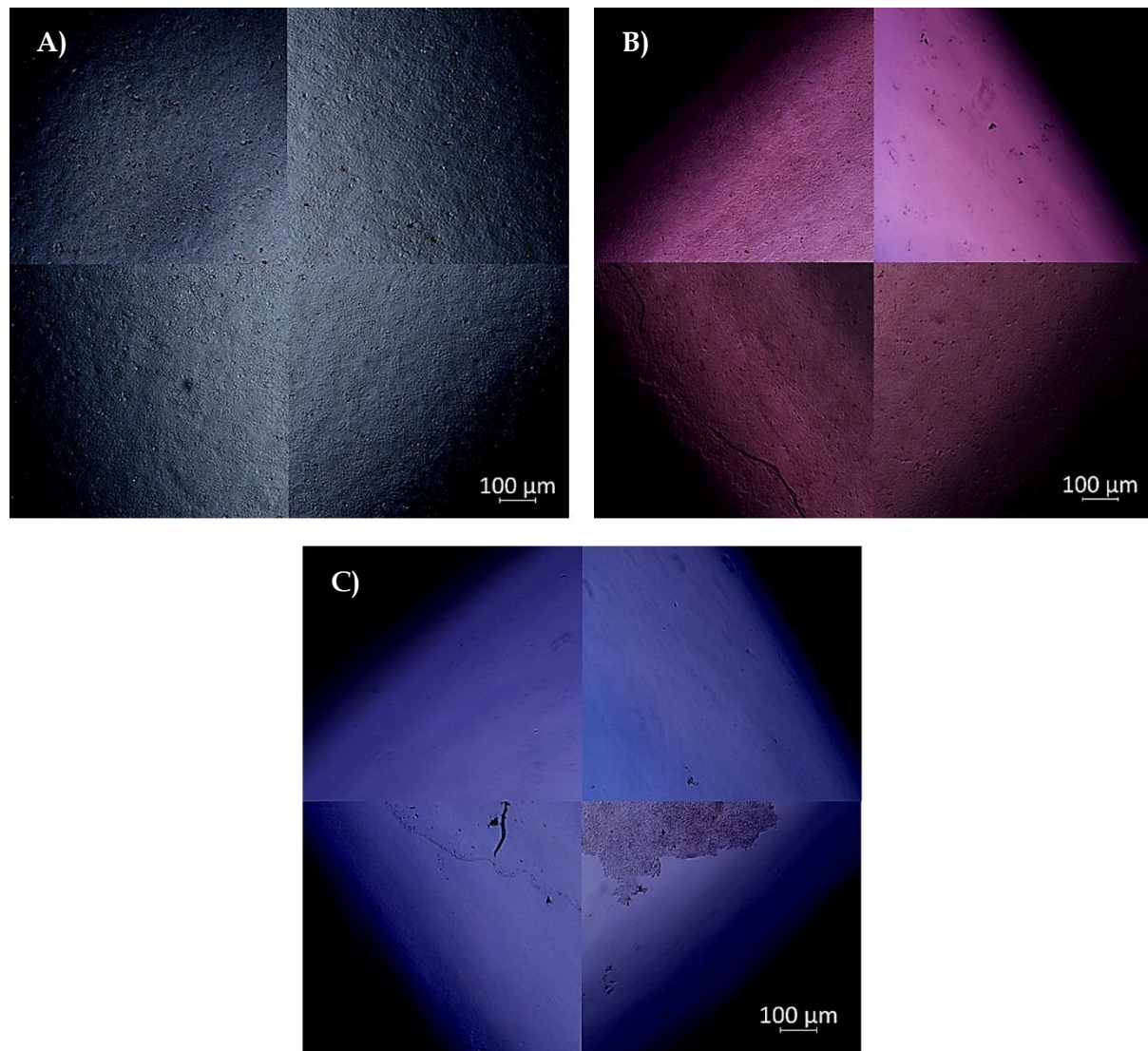


Figura 4.10. Fotografias representativas das diferentes etapas do processo de criopreservação a -80°C da monocamada de células HaCaT em placas de 6 poços. As imagens obtidas com o microscópio invertido Axio Vert A1 (Zeiss), com escala de $100\text{ }\mu\text{m}$, ilustram a evolução da monocamada ao longo do tempo: A) antes do congelamento, B) imediatamente depois do descongelamento (T0) e C) 2 dias após o descongelamento (T2). Esta figura refere-se ao congelamento utilizando a solução crioprotetora com 10% de Tre:Gli.

Estes resultados sugerem que as mudanças implementadas, embora teoricamente vantajosas, não foram suficientes para eliminar os danos celulares causados pelo processo de criopreservação. A persistência dos mesmos padrões de viabilidade e integridade celular indicam que outros fatores, além da temperatura de congelamento e da concentração de CPA, podem estar a influenciar negativamente o processo. Possíveis razões incluem danos irreversíveis à membrana celular ou às junções intercelulares durante o congelamento/descongelamento, bem como fatores anteriormente mencionados que podem estar a contribuir para estes

resultados, como a formação de cristais de gelo no interior das células que não foram adequadamente prevenidos pelos CPAs ou pelo controlo da taxa de arrefecimento ao colocar a placa a congelar no interior de uma caixa de esferovite, que hipoteticamente reduz o tamanho e a formação destes cristais, mas que pode não ter sido completamente eficaz; choque osmótico; e recristalização durante o descongelamento, problemas que não foram eficazmente resolvidos pelas alterações feitas ao protocolo.

Assim, torna-se evidente a necessidade da realização de um terceiro ensaio de congelamento, focado em estratégias passíveis ainda de adotar, para tentar minimizar os danos celulares observados até então. Neste terceiro ensaio, foi dado um “passo atrás” e foi realizado o congelamento em placas de 24 poços, uma abordagem possível devido ao processo de otimização do número inicial de células para obter uma monocamada confluyente ter sido realizados para todas as placas de cultura celular. Esta alteração ao protocolo teve como intuito reduzir o tempo de exposição das células durante o descongelamento, evitando, assim, possíveis problemas de recristalização e consequente choque osmótico. Dado que as otimizações anteriores, focadas principalmente no processo de congelamento, não foram suficientes, acreditamos que ao incorporar melhorias no descongelamento, podemos observar um aumento na viabilidade celular após a criopreservação da monocamada de células HaCaT. Mantivemos os CPAs e as concentrações usadas no segundo ensaio, bem como a temperatura de congelamento e o método em que foi feito, mas reduzimos a análise da viabilidade apenas ao momento após o descongelamento total dos poços (T0). Esta decisão foi tomada tendo em conta que o objetivo principal deste projeto sempre foi a criopreservação de uma monocamada de células da pele para aplicação imediata. Além disso, como nos ensaios anteriores não foram observadas recuperações celulares ao longo do tempo, esse fator acabou por ser descartado neste ensaio. Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas figuras 4.11 e 4.12.

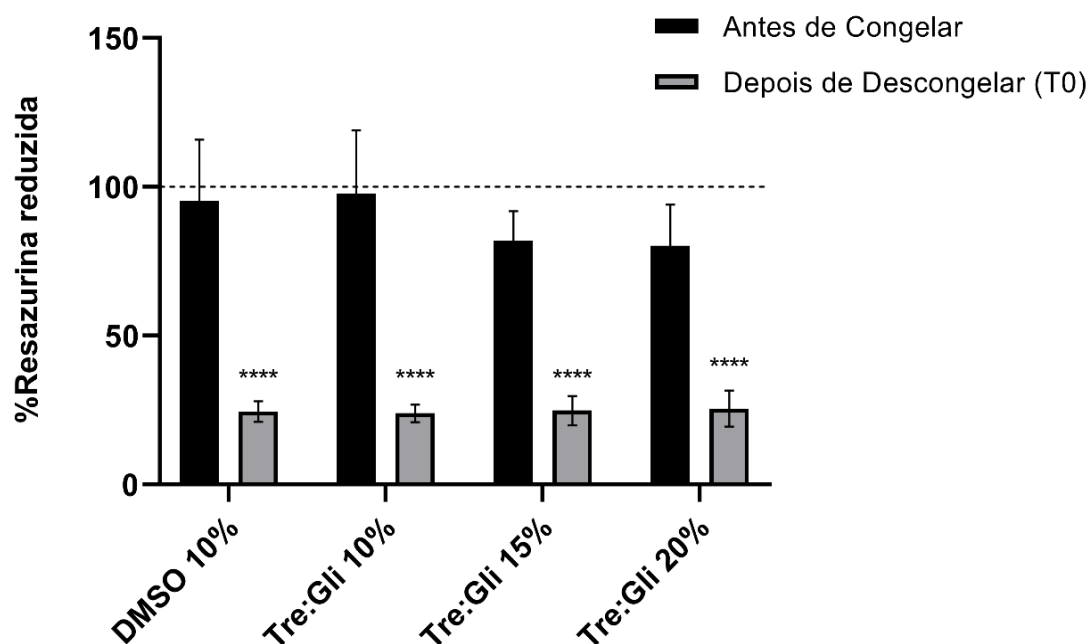


Figura 4.11. Quantidade de resazurina reduzida (%), obtida através do ensaio de viabilidade celular alamarBlue™ em placas de 24 poços, antes do congelamento da monocamada de células HaCaT e após uma semana, no dia em que foi descongelada (T0). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão (n=3). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste Bonferroni's para comparações múltiplas entre o momento antes do congelamento e após o descongelamento, para cada CPA em análise (DMSO a 10% e Tre:Gli a 10%, 15% e 20%), e estão representadas em asteriscos: ****p<0,0001, Two-way ANOVA.

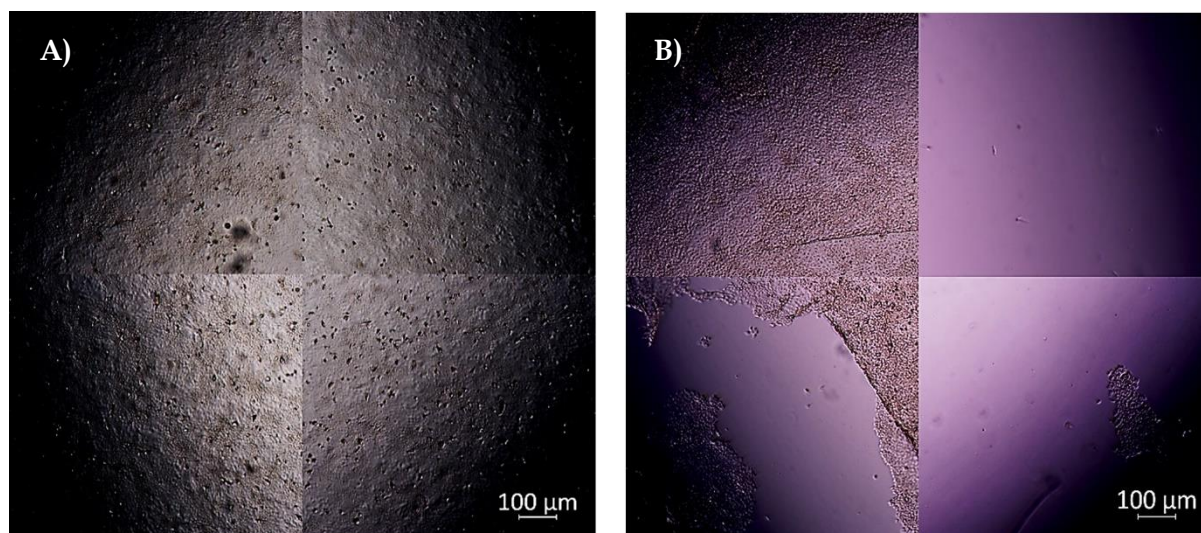


Figura 4.12. Fotografias representativas das diferentes etapas do processo de criopreservação a -80 °C da monocamada de células HaCaT em placas de 24 poços. As imagens obtidas com o microscópio invertido Axio Vert A1 (Zeiss), com escala de 100 µm, ilustram a evolução da monocamada ao longo do tempo: A) antes do congelamento, B) depois do descongelamento (T0). Esta figura refere-se ao congelamento utilizando a solução crioprotetora com 10% de Tre:Gli.

Os resultados obtidos no terceiro ensaio de congelamento foram consistentemente semelhantes aos dos dois ensaios anteriores, apesar da nova modificação implementada. Embora o congelamento tenha sido realizado em placas de 24 poços, o que teoricamente deveria facilitar a que o descongelamento fosse mais rápido devido ao menor volume de solução crioprotetora usada por poço, a viabilidade celular observada não apresentou melhorias em comparação com os ensaios anteriores. A viabilidade celular, avaliada pelo ensaio alamarBlue™ neste ensaio, continuou a mostrar uma redução acentuada logo após o descongelamento (T0), com valores entre 20% e 30%, e diferenças estatisticamente muito significativas (**** $p < 0,0001$) em relação aos valores de viabilidade antes do congelamento, para todas as condições testadas (10% DMSO e 10%, 15% e 20% Tre:Gli). Adicionalmente, a integridade da monocamada, avaliada através das imagens obtidas durante o ensaio (figura 4.12 e figura A.4 da Informação Suplementar), revelou padrões semelhantes aos observados anteriormente. A análise das imagens mostrou que, apesar da mudança para placas de 24 poços, a monocamada continuou a sofrer desintegração após o descongelamento (figura 4.12 B), em contraste com a coesão antes deste procedimento (figura 4.12 A), sendo que a perda de adesão celular e a fragmentação da monocamada foram evidentes logo após o descongelamento.

A expectativa inicial era que a redução do volume das placas de 6 poços para 24 poços acelerasse o processo de descongelamento e, portanto, melhorasse a viabilidade celular, ao evitar os problemas aqui em questão e, mencionados anteriormente. No entanto, os resultados indicam que esta otimização não teve o efeito desejado. Tal, pode ser explicado pela diferença na velocidade de descongelamento entre as placas não ter sido significativa, pelo que o descongelamento não foi suficientemente rápido para evitar os danos celulares, apesar do menor volume. Assim, a redução do volume das placas, que deveria teoricamente facilitar um descongelamento mais rápido e reduzir os problemas associados à recristalização e choque osmótico, não se traduziu numa melhoria prática nos resultados de viabilidade.

Em suma, os resultados obtidos nos três ensaios de congelamento realizados para a criopreservação de células HaCaT em monocamada revelaram ser consistentes, apesar das otimizações às condições do protocolo, tendo resultando sempre na diminuição significativa da viabilidade celular após o descongelamento e na desintegração da monocamada confluyente obtida antes do congelamento, o que indica que as alterações feitas não foram suficientes para superar os danos celulares observados. Ao comparar estes resultados com dados da literatura, observamos algumas semelhanças e diferenças que podem oferecer informações sobre a eficácia das condições utilizadas e sugerir novas otimizações.

Daily *et al* [92] estudaram a criopreservação de monocamadas celulares em placas de 96 poços, comparando condições com e sem controlo da taxa de congelamento. Utilizaram um “freezer” com taxa controlada para garantir um congelamento gradual e preciso, enquanto que o descongelamento foi realizado colocando as placas numa incubadora a 39 °C. Relataram que taxas de congelamento controladas resultam numa viabilidade celular mais elevada, cerca de 60%, após o descongelamento. Em contraste, quando este procedimento não é controlado, a viabilidade diminuiu para aproximadamente 30%. Além disso, observaram que a falta de controlo na taxa de arrefecimento provocou nucleação descontrolada, o que intensificou o

destacamento e a desintegração da monocamada celular. Estes resultados corroboram os baixos níveis de viabilidade celular observados no presente estudo. Apesar das otimizações no método de congelamento utilizado, o uso de uma caixa de esferovite não permite o controle total rigoroso e eficaz da taxa de congelamento, o que pode ter resultado numa nucleação descontrolada e, conseqüentemente, em danos celulares, refletidos nas viabilidades celulares obtidas entre 20% e 30%. A nucleação não controlada pode ter causado a formação de cristais de gelo maiores no interior das células, o que explica a baixa viabilidade celular, semelhante à observada por Daily *et al* sob condições de nucleação descontrolada. Adicionalmente, o método de descongelamento utilizado por Daily *et al*, que é semelhante ao método usado no presente estudo, resultou também em tempos prolongados de descongelamento (aproximadamente 10 minutos). Assim, os resultados obtidos neste estudo são comprovados pelos dados de Daily *et al*, devido à analogia entre os métodos de congelamento (não controlado) e descongelamento.

Por outro lado, ao comparar os resultados obtidos neste estudo com os obtidos por um estudo, que investigou a criopreservação de monocamadas de células estaminais do tecido adiposo [93], várias diferenças metodológicas e os seus impactos na viabilidade celular podem ser destacados. Neste outro estudo, as monocamadas celulares foram congeladas em criotubos, através do seu destacamento de placas termossensíveis, os quais são utilizados na criopreservação de células em suspensão, contrariamente ao método de congelamento feito neste estudo, em placas de cultura. O uso de criotubos permitiu um controle rigoroso da taxa de congelamento através de um CoolCell, uma abordagem que oferece um controle mais preciso e gradual do congelamento em comparação com a caixa de esferovite utilizada neste estudo, a qual pretendia mimetizar o CoolCell. Apesar de ambos os estudos terem utilizado a mesma temperatura de congelamento (-80 °C), por igual período de congelamento (uma semana), a capacidade do CoolCell para controlar a taxa de congelamento pode ter sido um fator determinante na obtenção de melhores resultados na viabilidade celular obtida no estudo de comparação. Além disso, o estudo feito por Prata *et al* [93] também utilizou 10% de DMSO como CPA. No entanto, obteve viabilidades celulares superiores a 75% após o descongelamento, enquanto os resultados obtidos neste estudo foram claramente mais baixos, variando entre 20% e 30%. Esta discrepância pode também ser explicada pelas diferenças no método de descongelamento, isto é, no outro estudo o descongelamento foi feito rapidamente em banho termostaticado a 37 °C durante 1-2 minutos, enquanto neste estudo o descongelamento foi feito numa incubadora a 37 °C, durante aproximadamente 10 minutos. O descongelamento rápido minimiza a recristalização e reduz o choque osmótico, o que contribuiu para os melhores resultados observados por Prata *et al* [93].

As comparações com a literatura sugerem que as condições de congelamento e descongelamento têm um impacto significativo na viabilidade celular pós-descongelamento, destacando a importância de uma otimização adicional dos métodos utilizados neste estudo. Acreditamos que, se os protocolos forem ajustados de forma a ultrapassar os problemas identificados, especialmente através da adoção de abordagens mais semelhantes àsquelas usadas na criopreservação de células em suspensão, os resultados seriam mais promissores. Assim, a

aplicação de técnicas mais rigorosas e ajustadas às necessidades específicas das monocamadas celulares pode ser a chave para melhorar a eficiência da criopreservação neste contexto.

4.6. Análise das soluções crioprotetoras por POM

Para compreender melhor o comportamento das soluções crioprotetoras utilizadas e analisadas ao longo deste estudo, foi realizada uma caracterização morfológica dessas soluções por microscopia ótica com luz polarizada (POM). Esta técnica permite identificar a presença de cristais de gelo utilizando luz polarizada. No entanto, como os NADES são sistemas amorfos à temperatura ambiente e, portanto, desprovidos de cristais [64], [73], foi necessário preparar e congelar diferentes soluções de DMEM + 10% (v/v) FBS com os NADES (Tre:Gli a 10%, 15% e 20%; Gli:Glu e Bet:Gli:Sac:H₂O a 10%) e com 10% (v/v) de DMSO, para verificar a existência de cristais de gelo durante o congelamento. Para isso, cada solução foi colocada numa lâmina de microscópio e congelada a -80 °C sob duas condições: 1) fora de uma caixa de esferovite e 2) no interior de uma caixa de esferovite. A segunda condição simula o uso do CoolCell no congelamento de células HaCaT em suspensão, pois este permite que o processo de congelamento seja gradual (1 °C/min) [89], o que ajuda a reduzir a formação de cristais de gelo.

Os resultados obtidos para a solução de DMEM + 10% (v/v) FBS e DMEM + 10% (v/v) com 10% (v/v) de DMSO, assim como um exemplo representativo das soluções contendo NADES, nas diferentes percentagens, especificamente da solução com 10% do sistema Tre:Gli, encontram-se apresentados na figura 4.13. As imagens correspondentes aos outros sistemas podem ser consultadas na figura A.5 da Informação Suplementar.

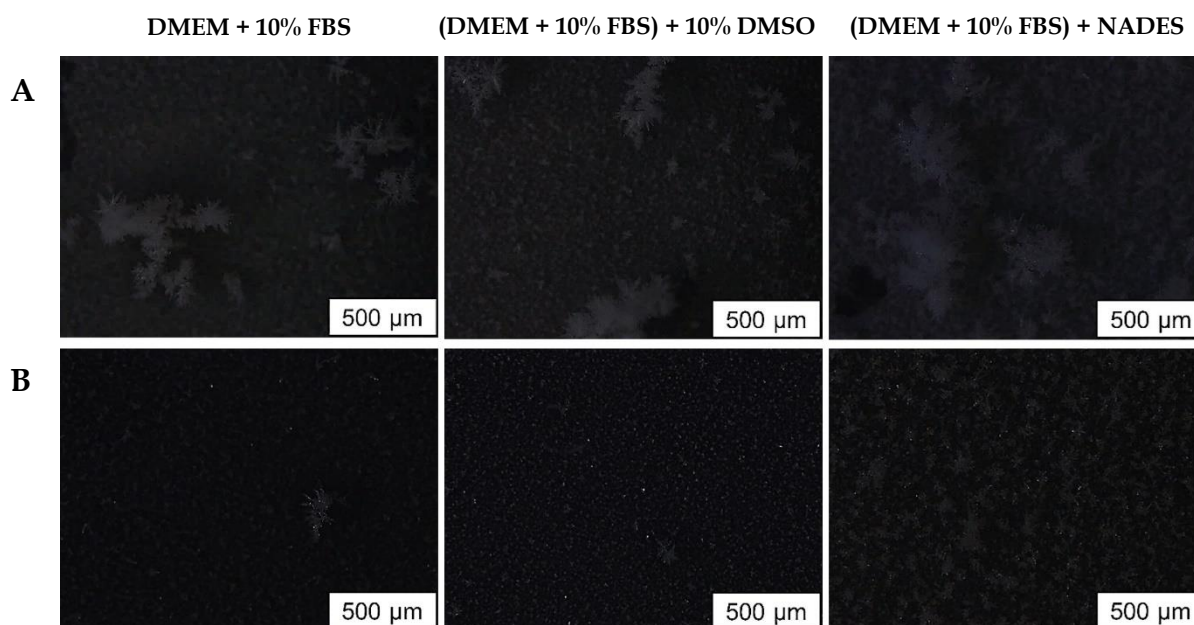


Figura 4.13. Imagens obtidas por microscopia ótica com luz polarizada (POM) da solução crioprotetora sem CPA (DMEM + 10% FBS), da solução crioprotetora com 10% (v/v) de DMSO e uma imagem representativa dos resultados obtidos com as soluções crioprotetoras contendo os NADES, especificamente da solução com 10% do sistema Tre:Gli. As imagens foram obtidas através de duas condições diferentes: A) amostras congeladas fora de uma caixa de esferovite, e B) amostras congeladas no interior de uma caixa de esferovite. A escala das imagens foi de 500 µm.

A análise da caracterização morfológica das soluções crioprotetoras por POM, revelou a existência de formação de cristais de gelo em todas as amostras, sob diferentes condições de congelamento. Estes resultados confirmam que, no congelamento com taxas de arrefecimento não controladas, como foi o caso nesta análise, a formação de cristais de gelo é inevitável, independentemente da presença do CPA, uma vez que até mesmo o DMSO a 10% apresentou cristais em ambas as condições.

Observou-se uma diferença clara entre o congelamento das soluções dentro e fora de uma caixa de esferovite. Nas soluções congeladas fora da caixa, houve uma presença significativa de cristais de gelo de maior tamanho, em todas as amostras. Em comparação, as soluções congeladas dentro da caixa de esferovite apresentaram uma redução significativa no tamanho dos cristais, sugerindo que a taxa de congelamento mais controlada pela caixa de esferovite mimetiza, de certa forma, o efeito do CoolCell. Assim, o uso da caixa de esferovite pode ser vantajoso na preservação da integridade celular, ao minimizar o tamanho dos cristais de gelo. Isto é fundamental, pois cristais maiores são mais prejudiciais às células, causando danos físicos, como a rutura da membrana celular, aumentando a probabilidade de choque osmótico durante o descongelamento [94].

Através destes resultados comprovamos a existência de cristais de gelo durante o congelamento das células HaCaT em monocamada com estes CPAs, o que pode impactar a viabilidade celular e, em conjunto com outros fatores, justificar a diminuição da viabilidade observada após o descongelamento. Sugerem ainda que, o uso de esferovite tem um impacto positivo na redução deste problema, contudo não é suficiente para eliminar completamente a formação dos cristais.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste projeto indicam que, embora os NADES demonstrem um potencial promissor como agentes crioprotetores (CPAs), ainda enfrentam desafios significativos na manutenção da viabilidade celular de monocamadas de células HaCaT após o descongelamento nas condições testadas.

A análise térmica das misturas de DMEM/NADES por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) revelou que os NADES selecionados apresentavam características promissoras como CPAs, influenciando as propriedades térmicas da solução controle sem CPA (DMEM + 10% de FBS), nomeadamente as temperaturas de fusão (T_m) e de cristalização (T_c). O comportamento térmico da solução depende tanto do sistema utilizado como CPA quanto da sua concentração na solução. Alguns sistemas demonstraram uma eficácia superior à do CPA padrão, o DMSO, na redução da T_m e da T_c .

Em seguida, observou-se que os tempos de descongelamento das soluções com NADES e DMSO, testadas como soluções crioprotetoras, foram prolongados, o que sugere que o método de descongelamento utilizado não é eficaz, e, conseqüentemente, o aumento prolongado da exposição das células em monocamada pode ter afetado a sua viabilidade celular. No entanto, as soluções contendo os NADES e o DMSO não apresentam citotoxicidade durante o período de descongelamento, devendo esta baixa viabilidade estar relacionada com fatores de stress, como a recristalização.

A análise da viabilidade celular da monocamada após o descongelamento revelou que tanto a criopreservação com a solução crioprotetora contendo DMSO quanto as soluções com os diferentes NADES, em concentrações distintas como foi o caso do sistema Tre:Gli, resultaram em viabilidades celulares muito baixas (entre 20% e 30%) em todos os ensaios de congelamento, mesmo com a realização de diferentes otimizações. Essas otimizações, feitas no sentido de minimizar a formação de cristais de gelo - um fator que impacta significativamente a viabilidade celular - incluíram a redução da temperatura de congelamento, o aumento da concentração de CPA e a minimização dos tempos de descongelamento, associados à recristalização em cristais de gelo maiores, não foram suficientes para evitar os danos celulares causados pelos cristais de gelo.

A caracterização morfológica das soluções crioprotetoras por microscopia ótica com luz polarizada (POM) demonstrou a formação de cristais de gelo durante o congelamento, com

todas as soluções crioprotetoras, independentemente do CPA utilizado. Contudo, os cristais apresentaram menor tamanho quando as soluções foram congeladas dentro de uma caixa de esferovite, que proporcionou uma taxa de arrefecimento mais gradual. Isto indica que um controlo mais rigoroso da taxa de congelamento minimizaria os danos celulares associados à formação de cristais de gelo, e consequentemente, em condições de congelamento não controladas, a formação de cristais de gelo é inevitável e mais prejudicial.

Em suma, com este estudo foi possível demonstrar que, embora os NADES selecionados apresentarem potencial como CPAs, tal não é suficiente para a preservação eficaz de monocamadas celulares. A presença inevitável de cristais de gelo utilizando este método de congelamento e os problemas associados ao método de descongelamento utilizado, indicam que são necessárias melhorias adicionais nos protocolos de congelamento e descongelamento.

PRESPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente estudo destacam a necessidade de continuar a investigar a eficácia dos Sistemas Eutéticos Profundos Naturais (NADES) como agentes crioprotetores na criopreservação de monocamadas celulares. Para avançar, são necessárias novas abordagens e otimizações em trabalhos futuros.

Primeiramente, é crucial reformular e otimizar os protocolos de congelamento e descongelamento. Estudos futuros devem explorar o controlo de diferentes taxas de congelamento e novos métodos que evitem os problemas identificados ao longo deste estudo. Após o melhoramento dos protocolos e a obtenção de taxas de viabilidade celular significativamente mais elevadas, será importante testar novamente as soluções crioprotetoras exploradas no presente estudo, as quais já se demonstraram eficazes na preservação de células HaCaT em suspensão. Além disso, deve-se testar a eficácia de outras soluções crioprotetoras baseadas em NADES, que possam oferecer uma proteção mais eficaz contra os danos celulares durante o congelamento e descongelamento.

A aplicação de soluções crioprotetoras com base em NADES a diferentes tipos celulares deve ser considerada. A eficácia dessas soluções pode variar consoante o tipo celular e a estruturas tecidual. Portanto, avaliar o desempenho dos NADES em diferentes contextos celulares irá determinar a sua versatilidade e aplicabilidade na criopreservação de entidades celulares complexas. Além disso, é importante compreender melhor os mecanismos de ação dos NADES como agentes crioprotetores, pois esta informação pode ajudar na formulação e aplicação das soluções crioprotetoras compostas por estes sistemas.

Por fim, é importante considerar a aplicação clínica de monocamadas celulares criopreservadas com soluções à base de NADES. A transição dos resultados obtidos em laboratório para o contexto clínico requer uma análise detalhada da segurança e eficácia dessas soluções. Estudos futuros devem avaliar o uso dos NADES na criopreservação bem-sucedida de células em monocamada para aplicações clínicas, como, por exemplo, a aplicação de monocamadas de queratinócitos em queimaduras. Adicionalmente, será relevante avaliar o potencial destes sistemas em larga escala, como alternativas menos tóxicas aos agentes crioprotetores tradicionais.

Em suma, para superar os desafios identificados neste estudo e alcançar uma criopreservação viável, eficaz e total de entidades celulares complexas, como tecidos, é essencial adotar novas estratégias. Assim, será possível obter avanços significativos na área da criopreservação.

BIBLIOGRAFIA

- [1] K. L. McKinley, M. T. Longaker, and S. Naik, "Emerging frontiers in regenerative medicine," *Science* (1979), vol. 380, no. 6647, pp. 796–798, May 2023, doi: 10.1126/science.add6492.
- [2] N. C. Henderson, F. Rieder, and T. A. Wynn, "Fibrosis: from mechanisms to medicines," Nov. 26, 2020, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41586-020-2938-9.
- [3] G. Hermerén, "The ethics of regenerative medicine," Jun. 01, 2021, *Akademiai Kiado ZRt*. doi: 10.1007/s42977-021-00075-3.
- [4] A. Petrosyan, P. N. Martins, K. Solez, B. E. Uygün, V. S. Gorantla, and G. Orlando, "Regenerative medicine applications: An overview of clinical trials," Nov. 25, 2022, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fbioe.2022.942750.
- [5] H. Jo, S. Brito, B. M. Kwak, S. Park, M. G. Lee, and B. H. Bin, "Applications of mesenchymal stem cells in skin regeneration and rejuvenation," Mar. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms22052410.
- [6] T. L. Palmieri, "Emerging Therapies for Full-Thickness Skin Regeneration," *J Burn Care Res*, vol. 44, no. 1, pp. S65–S67, Jan. 2023, doi: 10.1093/jbcr/irac102.
- [7] C. Chocarro-Wrona, E. López-Ruiz, M. Perán, P. Gálvez-Martín, and J. A. Marchal, "Therapeutic strategies for skin regeneration based on biomedical substitutes," Mar. 01, 2019, *Blackwell Publishing Ltd*. doi: 10.1111/jdv.15391.
- [8] A. M. Rahimi, M. Cai, and S. Hoyer-Fender, "Heterogeneity of the NIH3T3 Fibroblast Cell Line," *Cells*, vol. 11, no. 17, Sep. 2022, doi: 10.3390/cells11172677.
- [9] A. Mizukami and K. Swiech, "Mesenchymal stromal cells: From discovery to manufacturing and commercialization," *Stem Cells Int*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/4083921.
- [10] P. Li, Q. Ou, S. Shi, and C. Shao, "Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells/dental stem cells and their therapeutic applications," Jun. 01, 2023, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41423-023-00998-y.
- [11] Y. Wang, J. Fang, B. Liu, C. Shao, and Y. Shi, "Reciprocal regulation of mesenchymal stem cells and immune responses," Nov. 03, 2022, *Cell Press*. doi: 10.1016/j.stem.2022.10.001.
- [12] A. Nourian Dehkordi, F. Mirahmadi Babaheydari, M. Chehelgerdi, and S. Raeisi Dehkordi, "Skin tissue engineering: Wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies," Mar. 29, 2019, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s13287-019-1212-2.

- [13] M. N. M. Walter, K. T. Wright, H. R. Fuller, S. MacNeil, and W. E. B. Johnson, "Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays," *Exp Cell Res*, vol. 316, no. 7, pp. 1271–1281, Apr. 2010, doi: 10.1016/J.YEXCR.2010.02.026.
- [14] W. Zhang and X. Huang, "Stem cell-based drug delivery strategy for skin regeneration and wound healing: potential clinical applications," Dec. 01, 2023, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s41232-023-00287-1.
- [15] X. Wang, E. Wang, and G. Zhao, "Advanced cryopreservation engineering strategies: the critical step to utilize stem cell products," Dec. 01, 2023, *Springer*. doi: 10.1186/s13619-023-00173-8.
- [16] B. J. Fuller, "Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state.," *Cryo Letters*, vol. 25, no. 6, pp. 375–88, 2004.
- [17] J. Huebinger, H. M. Han, O. Hofnagel, I. R. Vetter, P. I. H. Bastiaens, and M. Grabenbauer, "Direct Measurement of Water States in Cryopreserved Cells Reveals Tolerance toward Ice Crystallization," *Biophys J*, vol. 110, no. 4, pp. 840–849, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.bpj.2015.09.029.
- [18] M. C. Schiewe and S. F. Mullen, "Vitrification: Fundamental Principles and Its Application for Cryopreservation of Human Reproductive Cells," in *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*, IntechOpen, 2018. doi: 10.5772/intechopen.79672.
- [19] A. R. Jesus, A. Paiva, and A. R. C. Duarte, "Current developments and future perspectives on biotechnology applications of natural deep eutectic systems," *Curr Opin Green Sustain Chem*, vol. 39, p. 100731, Feb. 2023, doi: 10.1016/J.COGSC.2022.100731.
- [20] J. K. Lewis *et al.*, "The Grand Challenges of Organ Banking: Proceedings from the first global summit on complex tissue cryopreservation," *Cryobiology*, vol. 72, no. 2, pp. 169–182, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2015.12.001.
- [21] S. J. Bryant *et al.*, "Deep eutectic solvents as cryoprotective agents for mammalian cells," *J Mater Chem B*, vol. 10, no. 24, pp. 4546–4560, 2022, doi: 10.1039/D2TB00573E.
- [22] M. J. Taylor, B. P. Weegman, S. C. Baicu, and S. E. Giwa, "New Approaches to Cryopreservation of Cells, Tissues, and Organs," *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, vol. 46, no. 3, p. 197, Jun. 2019, doi: 10.1159/000499453.
- [23] G. Marcantonini *et al.*, "Natural Cryoprotective and Cytoprotective Agents in Cryopreservation: A Focus on Melatonin," *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 3254, vol. 27, no. 10, p. 3254, May 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27103254.
- [24] D. Whaley, K. Damyar, R. P. Witek, A. Mendoza, M. Alexander, and J. R. T. Lakey, "Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations," *Cell Transplant*, vol. 30, Mar. 2021, doi: 10.1177/0963689721999617/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0963689721999617-FIG2.JPEG.
- [25] K. M. ; P. G. J. ; M. K. Krishna, "Vitrification: An Emerging Technique for Cryopreservation in Assisted Reproduction Programmes," *Embryo Talk* , vol. 1, pp. 210–227, 2006.

- [26] F. F. Abdelhafez, N. Desai, A. M. Abou-Setta, T. Falcone, and J. Goldfarb, "Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis," *Reprod Biomed Online*, vol. 20, no. 2, pp. 209–222, 2010, doi: 10.1016/J.RBMO.2009.11.013.
- [27] A. Gertrudes, R. Craveiro, Z. Eltayari, R. L. Reis, A. Paiva, and A. R. C. Duarte, "How Do Animals Survive Extreme Temperature Amplitudes? the Role of Natural Deep Eutectic Solvents," Nov. 06, 2017, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b01707.
- [28] D. E. Pegg, "Principles of cryopreservation," *Methods Mol Biol*, vol. 368, pp. 39–57, 2007, doi: 10.1007/978-1-59745-362-2_3.
- [29] G. M. Fahy and B. Wowk, "Principles of cryopreservation by vitrification," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1257, pp. 21–82, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2193-5_2.
- [30] C. J. Hunt, "Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1590, pp. 41–77, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6921-0_5.
- [31] B. Wowk, "Thermodynamic aspects of vitrification," *Cryobiology*, vol. 60, no. 1, pp. 11–22, Feb. 2010, doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2009.05.007.
- [32] G. Rapatz and B. Luyet, "Electron microscope study of erythrocytes in rapidly cooled suspensions containing various concentrations of glycerol," *Biodynamica*, vol. 10, no. 210, pp. 193–210, 1968.
- [33] W. F. Rall and G. M. Fahy, "Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification," *Nature*, vol. 313, no. 6003, pp. 573–575, 1985, doi: 10.1038/313573A0.
- [34] J. E. Swain and G. D. Smith, "Cryoprotectants," *Fertility Cryopreservation*, pp. 24–38, Jan. 2010, doi: 10.1017/CBO9780511730207.005.
- [35] L. L. Kuleshova, S. S. Gouk, and D. W. Hutmacher, "Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue-engineered constructs," *Biomaterials*, vol. 28, no. 9, pp. 1585–1596, Mar. 2007, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.11.047.
- [36] J. O. M. Karlsson and M. Toner, "Long-term storage of tissues by cryopreservation: Critical issues," *Biomaterials*, vol. 17, no. 3, pp. 243–256, 1996, doi: 10.1016/0142-9612(96)85562-1.
- [37] A. R. Jesus, L. Meneses, A. R. C. Duarte, and A. Paiva, "Natural deep eutectic systems – A new era of cryopreservation," *Adv Bot Res*, vol. 97, pp. 385–409, Jan. 2021, doi: 10.1016/BS.ABR.2020.09.015.
- [38] A. C. Drake, Y. Lee, E. M. Burgess, J. O. M. Karlsson, A. Eroglu, and A. Z. Higgins, "Effect of water content on the glass transition temperature of mixtures of sugars, polymers, and penetrating cryoprotectants in physiological buffer," *PLoS One*, vol. 13, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0190713.
- [39] G. M. Fahy, D. R. MacFarlane, C. A. Angell, and H. T. Meryman, "Vitrification as an approach to cryopreservation," *Cryobiology*, vol. 21, no. 4, pp. 407–426, Aug. 1984, doi: 10.1016/0011-2240(84)90079-8.

- [40] J. B. Mandumpal, C. A. Kreck, and R. L. Mancera, "A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, no. 9, pp. 3839–3842, Feb. 2011, doi: 10.1039/C0CP02326D.
- [41] B. Stokich, Q. Osgood, D. Grimm, S. Moorthy, N. Chakraborty, and M. A. Menze, "Cryopreservation of hepatocyte (HepG2) cell monolayers: impact of trehalose," *Cryobiology*, vol. 69, no. 2, pp. 281–290, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2014.08.001.
- [42] L. K. Bartolac, J. L. Lowe, G. Koustas, C. G. Grupen, and C. Sjöblom, "Effect of different penetrating and non-penetrating cryoprotectants and media temperature on the cryosurvival of vitrified in vitro produced porcine blastocysts," *Anim Sci J*, vol. 89, no. 9, pp. 1230–1239, Sep. 2018, doi: 10.1111/ASJ.12996.
- [43] A. R. Jesus, A. R. C. Duarte, and A. Paiva, "Use of natural deep eutectic systems as new cryoprotectant agents in the vitrification of mammalian cells," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-12365-4.
- [44] G. Kojayan, D. Whaley, M. Alexander, S. Rodriguez, S. Lee, and J. R. Lakey, "Improved cryopreservation yield of pancreatic islets using combination of lower dose permeable cryoprotective agents," *Cryobiology*, vol. 88, pp. 23–28, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2019.04.004.
- [45] B. P. Best, "Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions," *Rejuvenation Res*, vol. 18, no. 5, p. 422, Oct. 2015, doi: 10.1089/REJ.2014.1656.
- [46] M. Awan *et al.*, "Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity?," *Regenerative Med*, vol. 15, no. 3, pp. 1463–1491, Mar. 2020, doi: 10.2217/RME-2019-0145.
- [47] M. D. Ekpo, G. F. Bofo, J. Xie, X. Liu, C. Chen, and S. Tan, "Strategies in developing dimethyl sulfoxide (DMSO)-free cryopreservation protocols for biotherapeutics," *Front Immunol*, vol. 13, p. 1030965, Oct. 2022, doi: 10.3389/FIMMU.2022.1030965/BIBTEX.
- [48] C. Polge, A. U. Smith, and A. S. Parkes, "Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures," *Nature*, vol. 164, no. 4172, p. 666, 1949, doi: 10.1038/164666A0.
- [49] S. Bhattacharya and S. Bhattacharya, "Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process," *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*, Nov. 2018, doi: 10.5772/INTECHOPEN.80477.
- [50] E. Katenz *et al.*, "Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent," *Liver Transpl*, vol. 13, no. 1, pp. 38–45, 2007, doi: 10.1002/LT.20921.
- [51] A. D. Elbein, Y. T. Pan, I. Pastuszak, and D. Carroll, "New insights on trehalose: a multifunctional molecule," *Glycobiology*, vol. 13, no. 4, Apr. 2003, doi: 10.1093/GLYCOB/CWG047.
- [52] Z. Hubálek, "Protectants used in the cryopreservation of microorganisms," *Cryobiology*, vol. 46, no. 3, pp. 205–229, 2003, doi: 10.1016/S0011-2240(03)00046-4.

- [53] S. H. Huang, C. H. Wu, S. J. Chen, H. K. Sytwu, and G. J. Lin, "Immunomodulatory effects and potential clinical applications of dimethyl sulfoxide," *Immunobiology*, vol. 225, no. 3, May 2020, doi: 10.1016/J.IMBIO.2020.151906.
- [54] P. V. Dlodla *et al.*, "A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes," *Toxicol Rep*, vol. 5, pp. 1014–1020, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.TOXREP.2018.10.002.
- [55] G. Massiah *et al.*, "Cryopreservation of adipose tissue with and without cryoprotective agent addition for breast lipofilling: A cytological and histological study," *Cryobiology*, vol. 103, pp. 141–146, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2021.07.016.
- [56] T. Arakawa, J. F. Carpenter, Y. A. Kita, and J. H. Crowe, "The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis," *Cryobiology*, vol. 27, no. 4, pp. 401–415, Aug. 1990, doi: 10.1016/0011-2240(90)90017-X.
- [57] S. C. Kalhan, S. Mahajan, E. Burkett, L. Reshef, and R. W. Hanson, "Glyceroneogenesis and the source of glycerol for hepatic triacylglycerol synthesis in humans," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 16, pp. 12928–12931, Apr. 2001, doi: 10.1074/JBC.M006186200.
- [58] M. Dou, C. Lu, Z. Sun, and W. Rao, "Natural cryoprotectants combinations of l-proline and trehalose for red blood cells cryopreservation," *Cryobiology*, vol. 91, pp. 23–29, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2019.11.002.
- [59] W. K. Hendriks, B. A. J. Roelen, B. Colenbrander, and T. A. E. Stout, "Cellular damage suffered by equine embryos after exposure to cryoprotectants or cryopreservation by slow-freezing or vitrification," *Equine Vet J*, vol. 47, no. 6, pp. 701–707, Nov. 2015, doi: 10.1111/EVJ.12341.
- [60] B. Macías García *et al.*, "Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential," *Theriogenology*, vol. 77, no. 7, pp. 1280–1289, Apr. 2012, doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.10.033.
- [61] Y. M. Newman, S. G. Ring, and C. Colaco, "The role of trehalose and other carbohydrates in biopreservation," *Biotechnol Genet Eng Rev*, vol. 11, no. 1, pp. 263–294, 1993, doi: 10.1080/02648725.1993.10647903.
- [62] J. H. Crowe, L. M. Crowe, A. E. Oliver, N. Tsvetkova, W. Wolters, and F. Tablin, "The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state," *Cryobiology*, vol. 43, no. 2, pp. 89–105, Sep. 2001, doi: 10.1006/CRYO.2001.2353.
- [63] A. S. Teixeira, M. Faltus, J. Zámečník, M. E. González-Benito, and A. D. Molina-García, "Glass transition and heat capacity behaviors of plant vitrification solutions," *Thermochim Acta*, vol. 593, pp. 43–49, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.TCA.2014.08.015.
- [64] A. R. Jesus, L. Meneses, A. R. C. Duarte, and A. Paiva, "Natural deep eutectic systems, an emerging class of cryoprotectant agents," *Cryobiology*, vol. 101, p. 95, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2021.05.002.
- [65] B. Kudlak, K. Owczarek, and J. Namieśnik, "Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents – a review," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 22, no. 16, pp. 11975–11992, Aug. 2015, doi: 10.1007/s11356-015-4794-y.

- [66] P. Anastas and N. Eghbali, "Green Chemistry: Principles and Practice," *Chem Soc Rev*, vol. 39, no. 1, pp. 301–312, Dec. 2010, doi: 10.1039/b918763b.
- [67] M. Sajid and J. Plotka-Wasyłka, "Green analytical chemistry metrics: A review," *Talanta*, vol. 238, p. 123046, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2021.123046.
- [68] S. Ražić, J. Arsenijević, S. Đogo Mračević, J. Mušović, and T. Trtić-Petrović, "Greener chemistry in analytical sciences: from green solvents to applications in complex matrices. Current challenges and future perspectives: a critical review," Jun. 08, 2023, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d3an00498h.
- [69] B. B. Hansen *et al.*, "Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications," Feb. 10, 2021, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00385.
- [70] D. A. Alonso, A. Baeza, R. Chinchilla, G. Guillena, I. M. Pastor, and D. J. Ramón, "Deep Eutectic Solvents: The Organic Reaction Medium of the Century," *European J Org Chem*, vol. 2016, no. 4, pp. 612–632, Feb. 2016, doi: 10.1002/EJOC.201501197.
- [71] M. H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, G. C. Ngoh, W. F. Wong, and C. Y. Looi, "Emerging frontiers of deep eutectic solvents in drug discovery and drug delivery systems," *Journal of Controlled Release*, vol. 316, pp. 168–195, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.JCONREL.2019.09.019.
- [72] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R. L. Reis, and A. R. C. Duarte, "Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century," *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 2, no. 5, pp. 1063–1071, May 2014, doi: 10.1021/SC500096J.
- [73] V. I. B. Castro, R. Craveiro, J. M. Silva, R. L. Reis, A. Paiva, and A. R. Ana, "Natural deep eutectic systems as alternative nontoxic cryoprotective agents," *Cryobiology*, vol. 83, pp. 15–26, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.06.010.
- [74] R. Craveiro *et al.*, "Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents," *J Mol Liq*, vol. 215, pp. 534–540, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.MOLLIQ.2016.01.038.
- [75] M. Hayyan, M. A. Hashim, M. A. Al-Saadi, A. Hayyan, I. M. AlNashef, and M. E. S. Mirghani, "Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents," *Chemosphere*, vol. 93, no. 2, pp. 455–459, Sep. 2013, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.05.013.
- [76] M. Hayyan *et al.*, "Natural deep eutectic solvents: cytotoxic profile," *Springerplus*, vol. 5, no. 1, p. 913, Dec. 2016, doi: 10.1186/s40064-016-2575-9.
- [77] Y. H. Choi *et al.*, "Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?," *Plant Physiol*, vol. 156, no. 4, p. 1701, 2011, doi: 10.1104/PP.111.178426.
- [78] E. Durand, J. Lecomte, and P. Villeneuve, "From green chemistry to nature: The versatile role of low transition temperature mixtures," *Biochimie*, vol. 120, pp. 119–123, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.BIOCHI.2015.09.019.
- [79] Y. Dai, J. van Spronsen, G. J. Witkamp, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, "Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology," *Anal Chim Acta*, vol. 766, pp. 61–68, Mar. 2013, doi: 10.1016/J.ACA.2012.12.019.

- [80] T. El Achkar, S. Fourmentin, and H. Greige-Gerges, "Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds," *J Mol Liq*, vol. 288, p. 111028, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.MOLLIQ.2019.111028.
- [81] C. Florindo, F. S. Oliveira, L. P. N. Rebelo, A. M. Fernandes, and I. M. Marrucho, "Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids," *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 2, no. 10, pp. 2416–2425, Oct. 2014, doi: 10.1021/SC500439W.
- [82] Y. Dai, G. J. Witkamp, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, "Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications," *Food Chem*, vol. 187, pp. 14–19, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.03.123.
- [83] H. Monteiro, A. Paiva, A. R. C. Duarte, and N. Galamba, "Structure and Dynamic Properties of a Glycerol-Betaine Deep Eutectic Solvent: When Does a des Become an Aqueous Solution?," *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 10, no. 11, pp. 3501–3512, Mar. 2022, doi: 10.1021/ACSSUSCHEMENG.1C07461/ASSET/IMAGES/LARGE/SC1C07461_0008.JPEG.
- [84] Y. Liu, J. B. Friesen, J. B. McAlpine, D. C. Lankin, S. N. Chen, and G. F. Pauli, "Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives," Mar. 23, 2018, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00945.
- [85] K. Hornberger, R. Li, A. R. C. Duarte, and A. Hubel, "Natural deep eutectic systems for nature-inspired cryopreservation of cells," *AIChE Journal*, vol. 67, no. 2, Feb. 2021, doi: 10.1002/aic.17085.
- [86] "alamarBlue® Assay," U.S. Patent No. 5,501,959
- [87] K. Matsumura and S. H. Hyon, "Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties," *Biomaterials*, vol. 30, no. 27, pp. 4842–4849, Sep. 2009, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.05.025.
- [88] A. W. Abdelhady, D. W. Mittan-Moreau, P. L. Crane, M. J. McLeod, S. H. Cheong, and R. E. Thorne, "Ice formation and its elimination in cryopreservation of oocytes," *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, Aug. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-69528-8.
- [89] R. I. Freshney, "Culture of Specific Cell Types," *Culture of Animal Cells*, pp. 375–420, Oct. 2005, doi: 10.1002/0471747599.CAC023.
- [90] P. Kilbride and J. Meneghel, "Freezing technology: Control of freezing, thawing, and ice nucleation," *Methods in Molecular Biology*, vol. 2180, pp. 191–201, 2021, doi: 10.1007/978-1-0716-0783-1_6/FIGURES/1.
- [91] M. Uhrig, F. Ezquer, and M. Ezquer, "Improving Cell Recovery: Freezing and Thawing Optimization of Induced Pluripotent Stem Cells," *Cells*, vol. 11, no. 5, p. 799, Mar. 2022, doi: 10.3390/CELLS11050799/S1.
- [92] M. I. Daily *et al.*, "Cryopreservation of primary cultures of mammalian somatic cells in 96-well plates benefits from control of ice nucleation," *Cryobiology*, vol. 93, pp. 62–69, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2020.02.008.

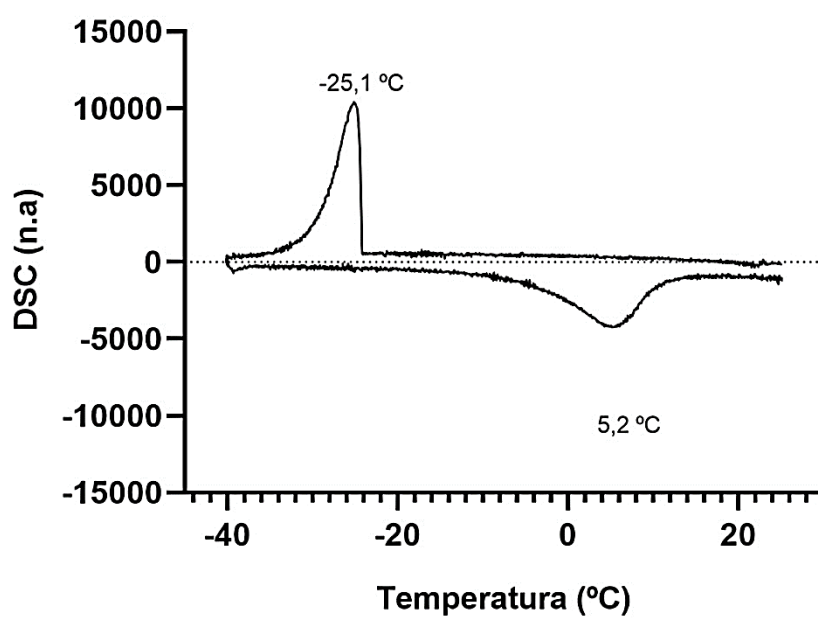
- [93] Fábio Emanuel Pires Aibeo Prata, "ESTABLISHMENT OF A PROTOCOL FOR THE CRYOPRESERVATION OF CELL SHEETS OF ADIPOSE TISSUE STEM CELLS," 2016.
- [94] X.-Y. Sun and J.-M. Ouyang, "New view in cell death mode: effect of crystal size in renal epithelial cells," *Cell Death & Disease* , vol. 6, Dec. 2015, doi: 10.1038/cddis.2015.359.

INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR

A.1. Análise por DSC

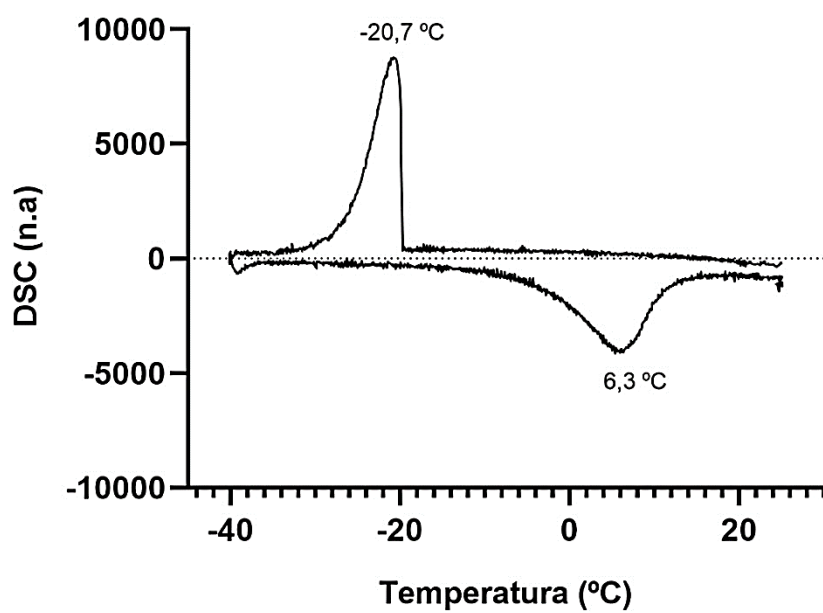
A

10%Gli:Glu + 90%(DMEM + FBS)



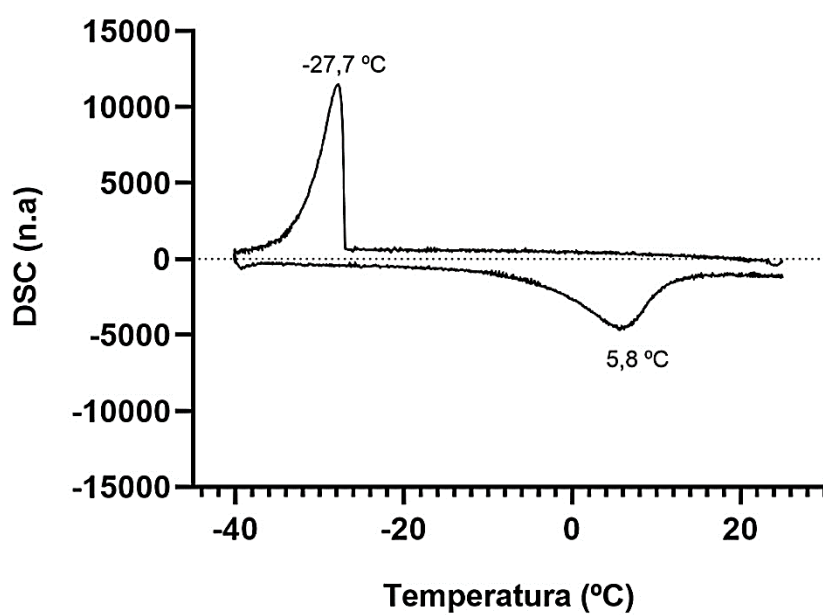
B

10%Bet:Gli:Sac:H₂O + 90%(DMEM + FBS)

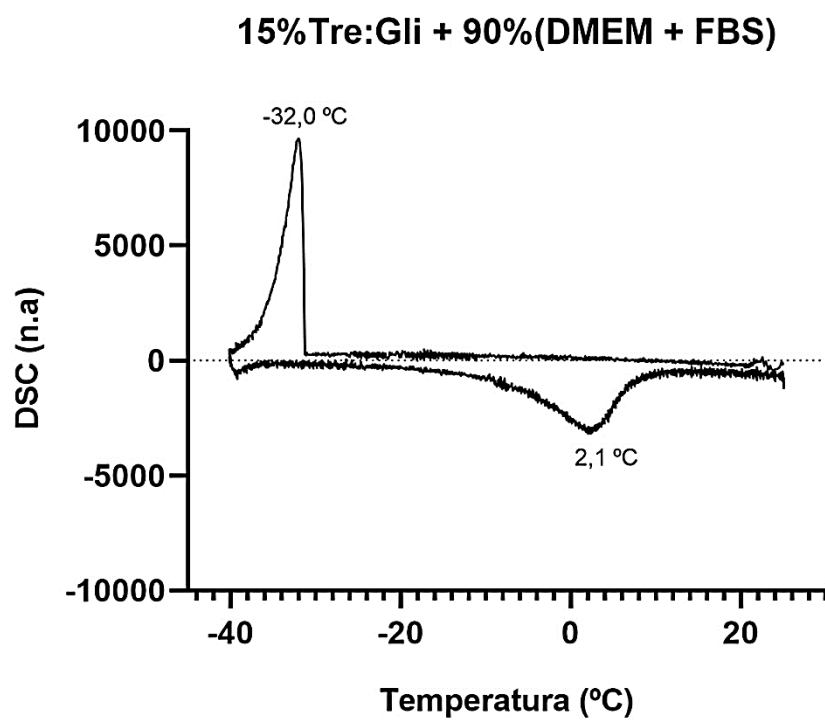


C

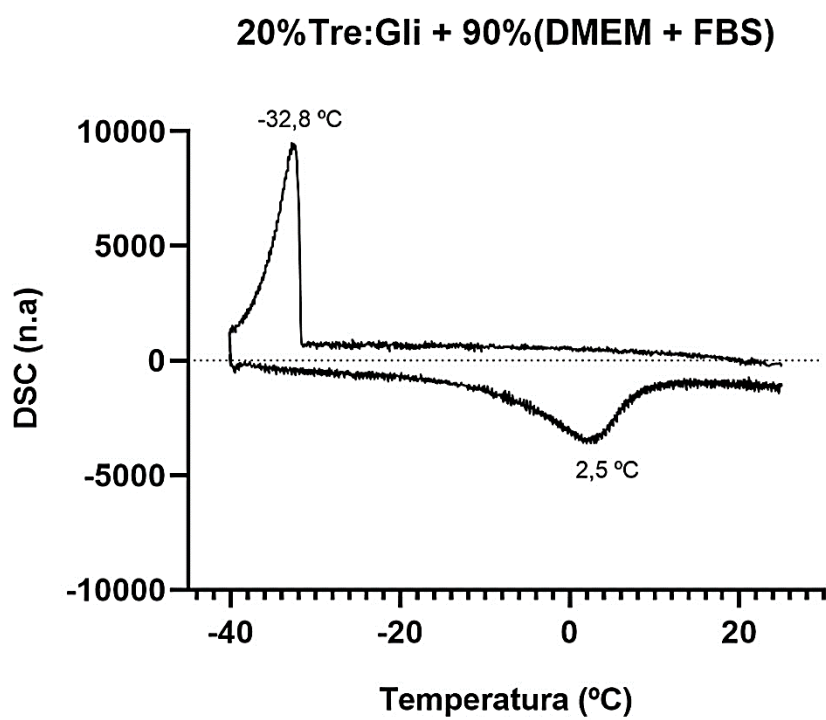
10%Tre:Gli + 90%(DMEM + FBS)



D



E



F

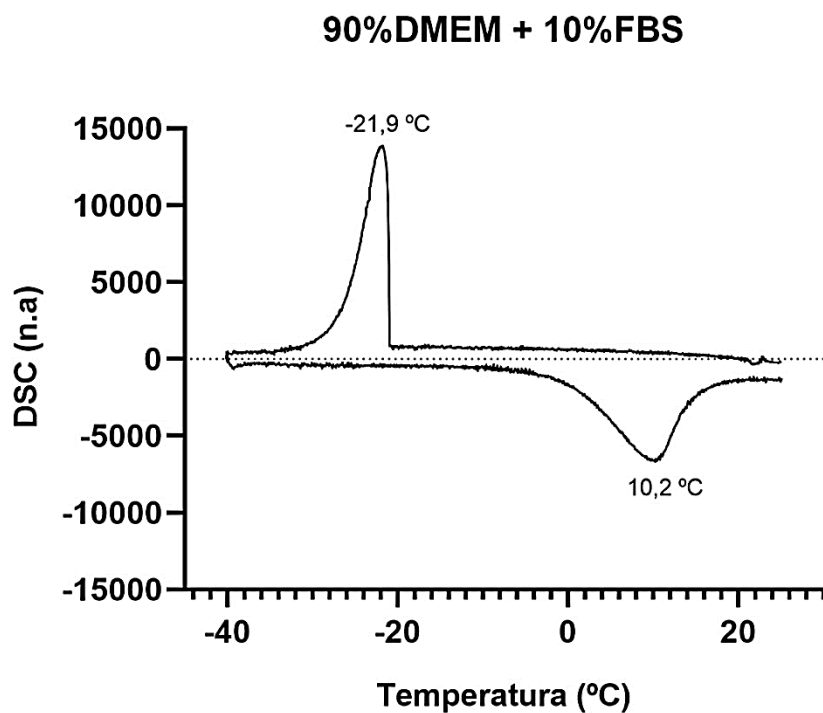
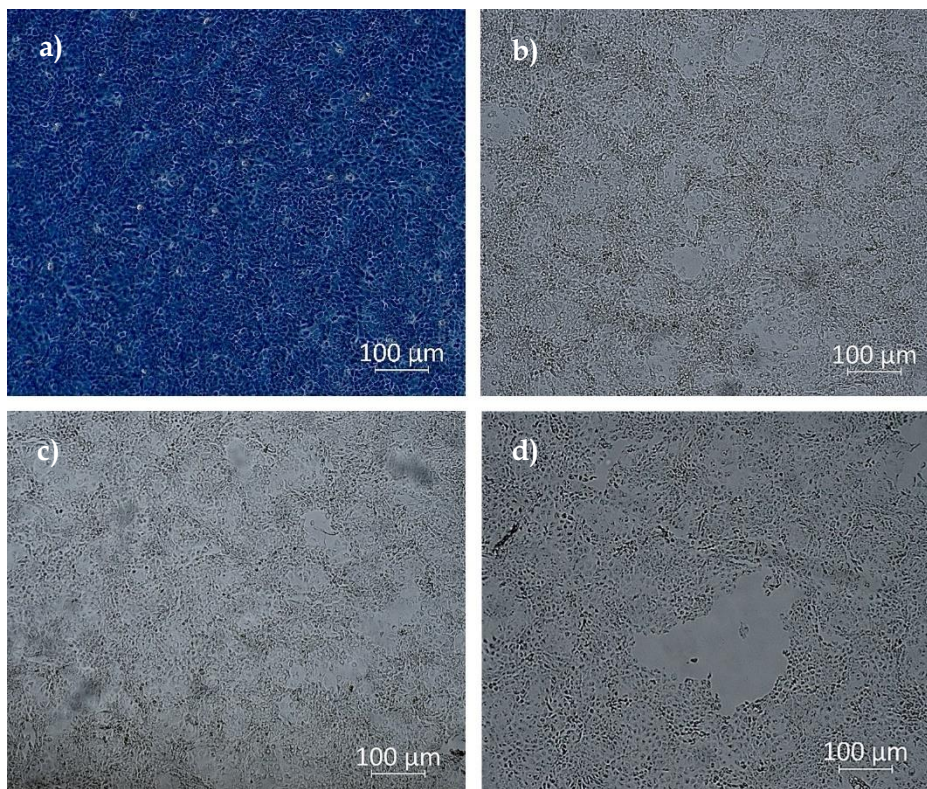


Figura A.1. Termogramas das soluções de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, nas seguintes condições: A) com 10% de Gli:Glu; B) com 10% de Bet:Gli:Sac:H₂O; C) com 10% de Tre:Gli; D) com 15% de Tre:Gli; E) com 20% de Tre:Gli; e F) apenas DMEM + 10% FBS.

A.2. Criopreservação a -20 °C em placas de 6 poços

A



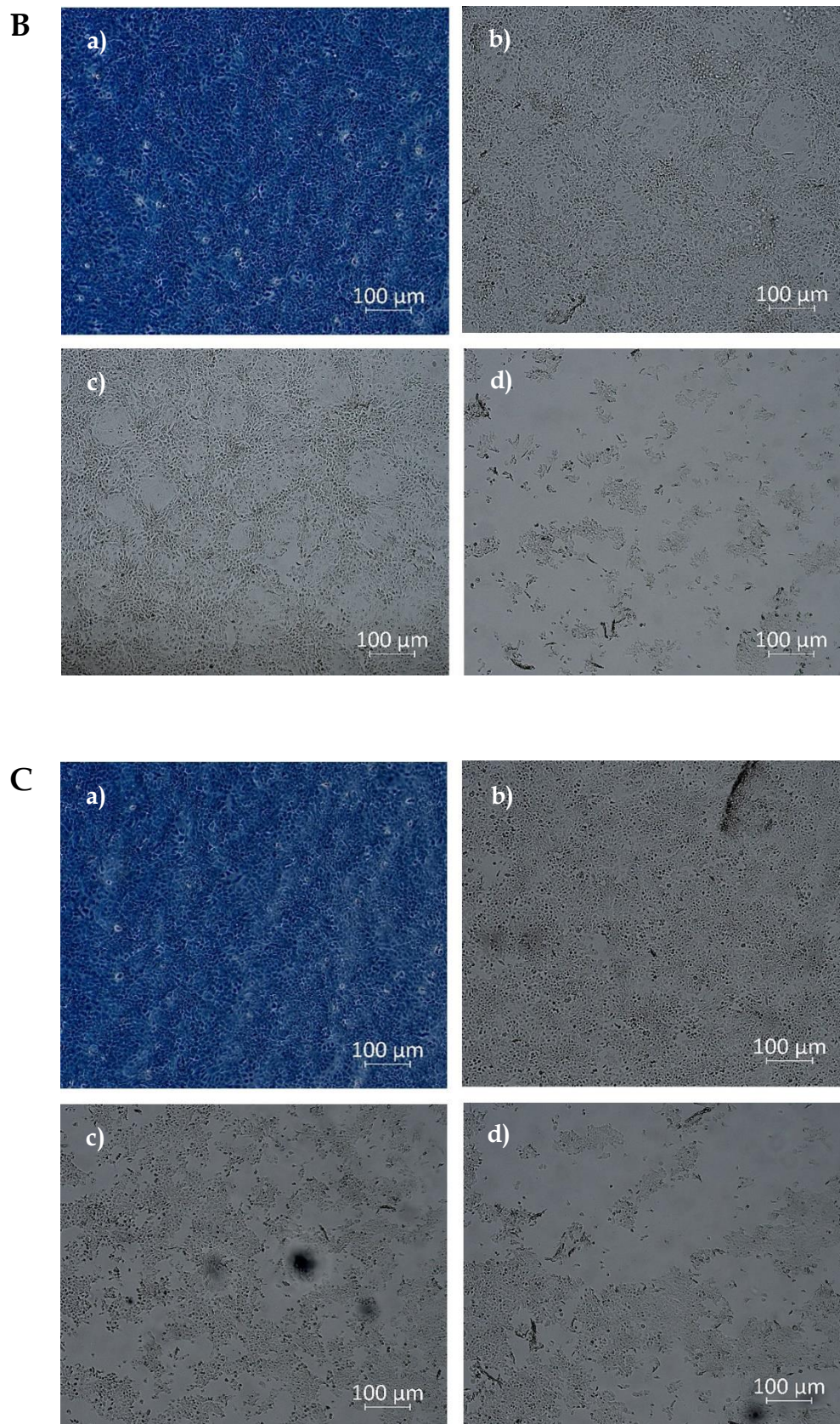
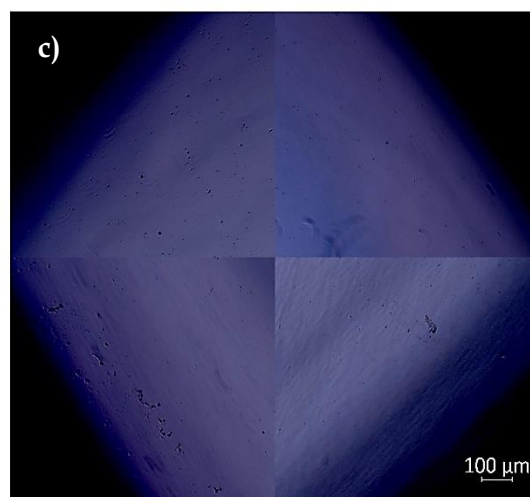
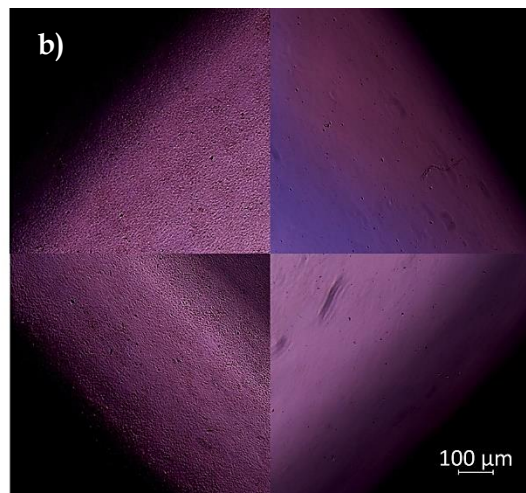
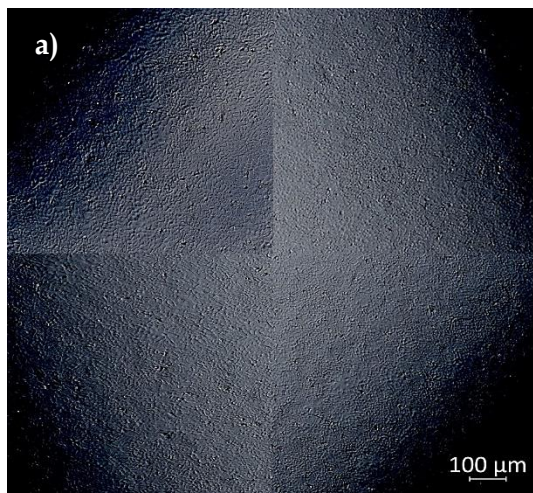


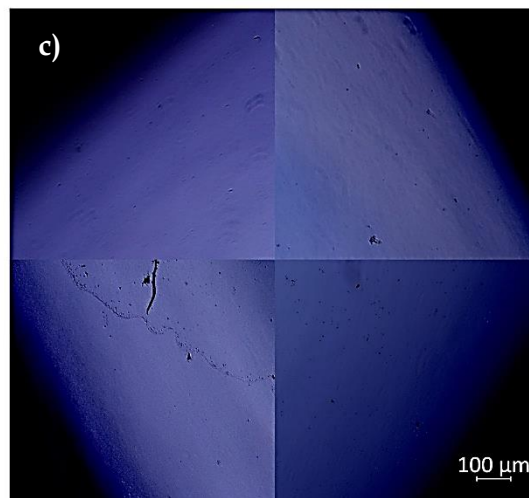
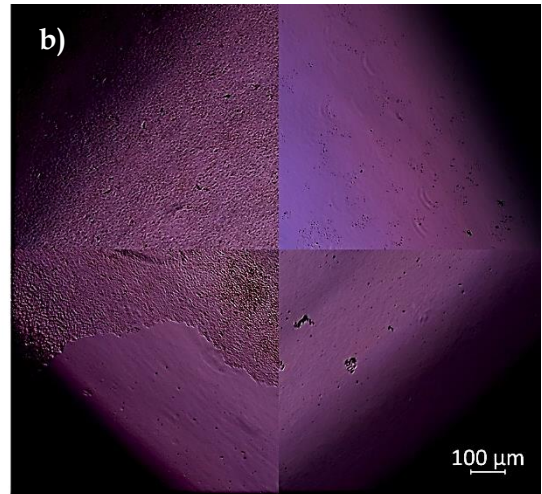
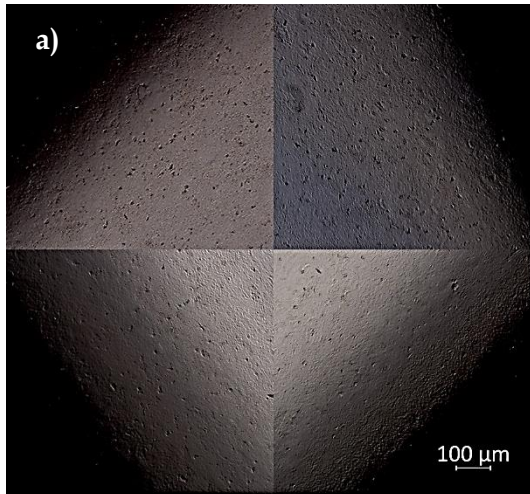
Figura A.2. Fotografias das diferentes etapas do processo de criopreservação a -20°C da monocamada de células HaCaT em placas de 6 poços, utilizando as soluções crioprotetoras com os CPAs em análise: A) 10% DMSO, B) 10% Gli:Glu e C) 10% Bet:Gli:Sac:H₂O. As imagens obtidas com o microscópio invertido Axio Vert A1 (Zeiss), com escala de 100 μm , ilustram a evolução da monocamada ao longo do tempo: a) antes do congelamento, b) imediatamente após o descongelamento (T0), c) 1 dia após o descongelamento (T1) e, d) 2 dias após o descongelamento (T2).

A.3. Criopreservação a -80 °C em placas de 6 poços

A



B



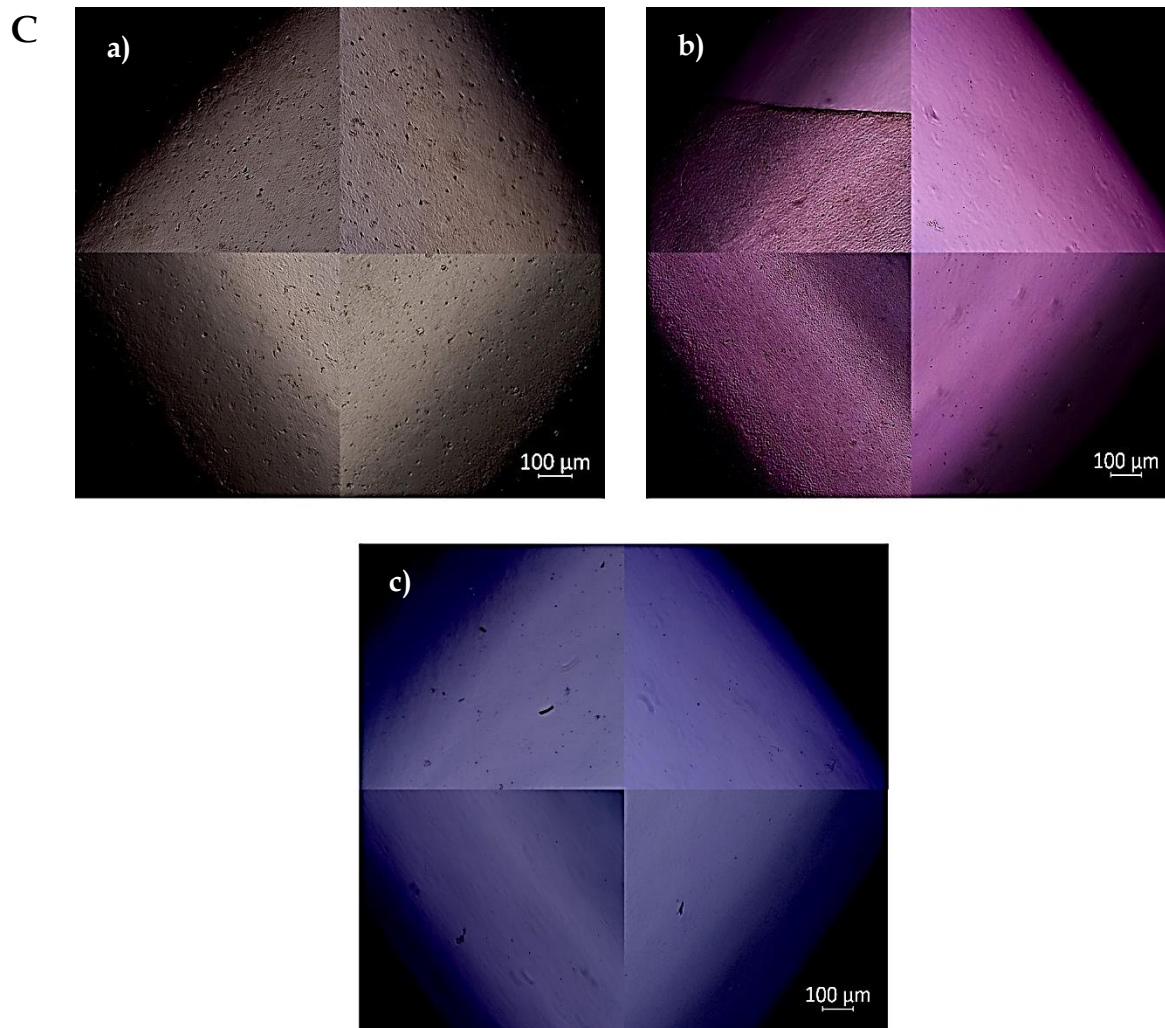


Figura A.3. Fotografias das diferentes etapas do processo de criopreservação a -80°C da monocamada de células HaCaT em placas de 6 poços, utilizando as soluções crioprotetoras com os CPAs em análise: A) 10% DMSO, B) 15% Tre:Gli e, C) 20% Tre:Gli. As imagens obtidas com o microscópio invertido Axio Vert A1 (Zeiss), com escala de 100 μm , ilustram a evolução da monocamada ao longo do tempo: a) antes do congelamento, b) imediatamente após o descongelamento (T0) e, c) 2 dias após o descongelamento (T2).

A.4. Criopreservação a -80 °C em placas de 24 poços

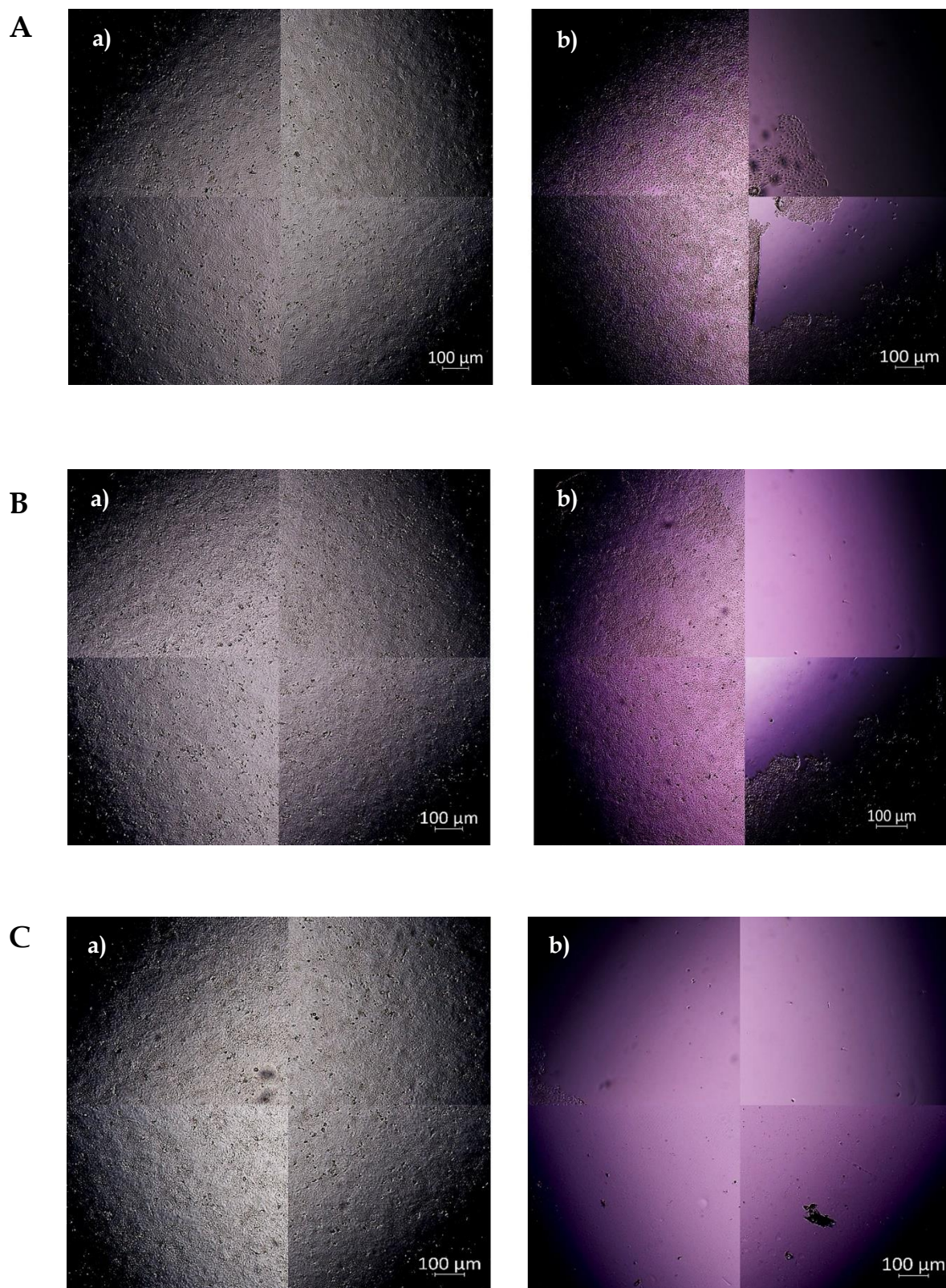


Figura A.4. Fotografias das diferentes etapas do processo de criopreservação a -80 °C da monocamada de células HaCaT em placas de 24 poços, utilizando as soluções crioprotetoras com os CPAs em análise: A) 10% DMSO, B) 15% Tre:Gli e, C) 20% Tre:Gli. As imagens obtidas com o microscópio invertido Axio Vert A1 (Zeiss), com escala de 100 µm, ilustram a evolução da monocamada ao longo do tempo: a) antes do congelamento e, b) imediatamente após o descongelamento (T0).

A.5. Análise por POM

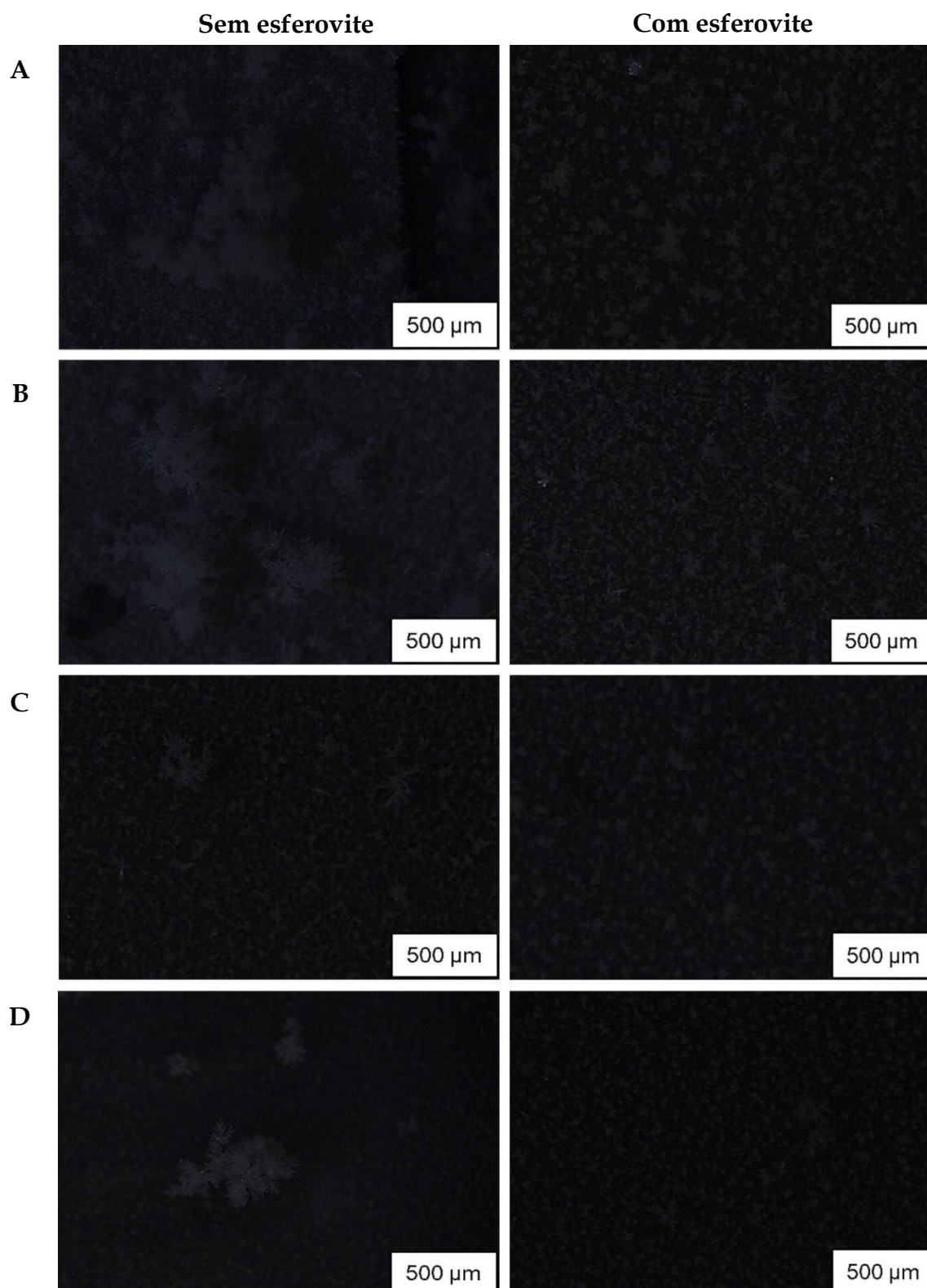


Figura A.5. Imagens obtidas por microscopia ótica com luz polarizada (POM) das soluções crioprotetoras de DMEM suplementado com 10% de FBS com: A) 15% Tre:Gli, B) 20% Tre:Gli, C) 10% Gli:Glu e, D) 10% Bet:Gli:Sac:H₂O. As imagens foram obtidas através de duas condições diferentes: 1) amostras congeladas fora de uma caixa de esferovite, e 2) amostras congeladas no interior de uma caixa de esferovite. A escala das imagens foi de 500 μ m.



2024

ANDREIA FILIPA ESPANHOL SILVA

MÉTODO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE UMA MONOCAMADA DE
QUERATINÓCITOS COM BASE EM SISTEMAS EUTÉTICOS
PROFUNDOS NATURAIS